# ZEITSCHRIFT

FÜR

# VERERBUNGSLEHRE

HERAUSGEGEBEN UND GELEITET

VON

CH. AUERBACH · H. BAUER · E. HADORN
F. KAUDEWITZ · A. KÜHN · G. MELCHERS · F. OEHLKERS
F. RYAN · H. STUBBE

90. BAND

MIT 214 TEXTABBILDUNGEN, DAVON 1 FARBIGE

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1959

Alle Rechte, einschließlich das der Übersetzung in fremde Sprachen und das der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung, vorbehalten. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen*

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Springer-Verlag OHG / Berlin · Göttingen · Heidelberg

Printed in Germany

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

FUMIGATED 1995

65-27524
jn
QH301
Z4
v.90

# Inhalt des 90. Bandes

## 1. Heft

(Abgeschlossen am 31. März 1959)

Seite

CATTANACH, B. M., The sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of triethylenemelamine . . . . . 1

HUNTER, P. E., Selection of *Drosophila melanogaster* for length of larval period. With 4 Figures in the Text . . . . . 7

ESSER, K., Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. (CES.) REHM. II. Die Wirkungsweise der Semi-Incompatibilitäts-Gene. Mit 10 Textabbildungen . . . . . 29

ZIEGLER-GÜNDER, I., und L. JAENICKE, Zur Wirkungsweise des *white*-Allels bei *Drosophila melanogaster*. Mit 5 Textabbildungen . . . . . 53

FIEDLER, H., und J. SCHREITER, Das Pachytän-Genom von *Solanum vernei*. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 62

TAKAHASHI, T., and Y. IKEDA, Genetic analysis of α-methyl-glucoside fermentation in *Saccharomyces*. With 2 Figures in the Text . . . . . 66

EBERSOLD, W. T., and R. P. LEVINE, A genetic analysis of linkage group I of *Chlamydomonas reinhardi*. With 2 Figures in the Text . . . . . 74

KÄLIN, A., und H. BURLA, Biometrischer Vergleich zweier Populationen von *Drosophila obscura* . . . . . 83

ANDERS, A., Genetische und histologische Untersuchungen über das Augenpigmentsystem von *Gammarus pulex* L. *(Crust. amph.)* Mit 5 Textabbildungen . . . . . 94

RÖHRBORN, G., Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. Mit 1 Textabbildung . . . . . 116

RENNER, O., Paralipomena zur Genetik von *Oenothera*. Mit 11 Textabbildungen . . . 132

RYAN, F. J., R. RUDNER, T. NAGATA and Y. KITANI, Bacterial mutation and the synthesis of macromolecules. With 8 Figures in the Text . . . . . 148

## 2. Heft

(Abgeschlossen am 15. Juli 1959)

HONDELMANN, W., Untersuchungen an einem mutablen Blütenfarbgen von *Callistephus chinensis* NEES. Mit 6 Textabbildungen . . . . . 159

KIRITANI, K., Selection of fitter type nuclei in heterocaryons of *Aspergillus oryzae*. With 4 Figures in the Text . . . . . 182

KIRITANI, K., and Y. IKEDA, Heterosis observed in *Aspergillus oryzae* and its significance in Koji manufacture. With 4 Figures in the Text . . . . . 190

GOTTSCHALK, W., Die Bildung von Keimzellen mit euploiden Chromosomenzahlen aus triploiden und aneuploiden Pollenmutterzellen abregulierender polyploider Pflanzen. Mit 12 Textabbildungen . . . . . 198

LEVINE, R. P., and C. E. FOLSOME, The nuclear cycle in *Chlamydomonas reinhardi*. With 17 Figures in the Text . . . . . 215

BELITZ, H. J., Chromosomenfragmente, minutes und sichtbare Mutationen bei *Drosophila* nach Behandlung mit Chinon I . . . . . 223

SEYFFERT, W., Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen. II. „Superdominanz" bei *Silene armeria* L. Mit 2 Textabbildungen . . . . . 231

KÜHN, A., und A. EGELHAAF, Über die Mutation *br* (braunäugig) bei *Ephestia kühniella*. Mit 11 Textabbildungen . . . . . 244

MAINX, F., Die Geschlechtsverhältnisse der Phoride *Megaselia scalaris* und das Problem einer alternativen Geschlechtsbestimmung . . . . . 251

ROHNER, M. C., The influence of depression of respiratory metabolism by carbon monoxide on the pigment development in the insect eye. With 1 coloured Figure in the Text . . . . . 257

CASPARI, E., and F. J. GOTTLIEB, On a modifier of the gene *a* in *Ephestia kühniella*. With 8 Figures in the Text . . . . . 263

SPERLICH, D., Experimentelle Beiträge zum Problem des positiven Heterosiseffektes bei der strukturpolymorphen Art *Drosophila subobscura*. . . . . 273

STUBBE, W., Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 288

### 3. Heft

(Abgeschlossen am 6. November 1959)

Seite

Faulhaber, I., Biochemische Untersuchungen zum Eiweiß-Stoffwechsel der Letalmutante *lethal giant larvae (lgl)* von *Drosophila melanogaster*. Mit 29 Textabbildungen 299

Auerbach, Ch., Spontaneous mutations in dry spores of *Neurospora crassa*. With 2 Figures in the Text . . . . . 335

Kohiyama, M., Genetic interaction observed in *Bacillus subtilis*. With 5 Figures in the Text . . . . . 347

Seyffert, W., Theoretische Untersuchungen über die Zusammensetzung tetrasomer Populationen. II. Selbstbefruchtung. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 356

Berichtigung zur Arbeit W. Seyffert, Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen II, Z. Vererb.-Lehre, Bd. 90, 231—243 (1959) . . . . . 374

Green, M. M., Putative non-reciprocal crossing over in *Drosophila melanogaster* . . . 375

Swaminathan, M. S., and K. Sulbha, Multivalent frequency and seed fertility in raw and evolved tetraploids of *Brassica Campestris* var. *toria*. With 9 Figures in the Text 385

Swaminathan, M. S., and B. R. Murty, Effect of X-radiation on pollen tube growth and seed setting in crosses between *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*. With 2 Figures in the Text . . . . . 393

Bauer, L., und M. Brosig, Zur Kenntnis reziproker Kreuzungen von *Funariaceen*. I. Die Bastarde *Funaria hygrometrica* × *Physcomitrium acuminatum* und reziprok. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 400

Möller, E., Über Chromatideninterferenz. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 409

Löbbecke, E.-A., und I. Müller, Über die Auslösung von somatischen Mutationen bei *Ephestia kühniella* Z. durch weiche und mittelharte Röntgenstrahlen (10—100 kV). Mit 2 Textabbildungen . . . . . 421

Harm, W., Untersuchungen zur Wirkungsweise eines die UV-Empfindlichkeit bestimmenden Gens der Bakteriophagen T 2 und T 4. Mit 7 Textabbildungen . . . . . 428

### 4. (Schluß)-Heft

(Abgeschlossen am 31. Dezember 1959)

Esser, K., Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. III. Untersuchungen zur Genphysiologie der Barragebildung und Semi-Incompatibilität. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 445

Röhrborn, G., Mutagenitätsuntersuchungen mit 1,4-Dimethylsulfonoxy-1,4-Dimethylbutan an *Drosophila melanogaster* . . . . . 457

Wittmann, H. G., Vergleich der Proteine des Normalstamms und einer Nitritmutante des Tabakmosaikvirus. Mit 2 Textabbildungen . . . . . 463

Bergfeld, R., Über das Verhalten zweier Zwergformmutanten von *Antirrhinum majus* L. bei Pfropfung und Behandlung mit Gibberellinsäure. Mit 5 Textabbildungen . . . . 476

Stein, O. L., and D. M. Steffensen, The activity of X-rayed apical meristems: A genetic and morphogenetic analysis in *Zea mays*. With 15 Figures in the Text . . . . . 483

Kurze Mitteilung

Röbbelen, G., Untersuchungen über die Entwicklung der submikroskopischen Chloroplastenstruktur in Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana*. Mit 1 Textabbildung . 503

Autorenverzeichnis . . . . . 507

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 1—6 (1959)

Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh

# THE SENSITIVITY OF THE MOUSE TESTIS TO THE MUTAGENIC ACTION OF TRIETHYLENEMELAMINE

By

B. M. Cattanach

*(Eingegangen am 17. Oktober 1958)*

## Introduction

Intraperitoneal injections of solutions of triethylenemelamine (TEM) induce a reduction in the fertility of male rats (Jackson and Bock 1955; Bock and Jackson 1957; Craig *et al.* 1958) and mice (Cattanach 1957; Cattanach and Edwards 1958). Following single doses of the drug the fertility of male rats is reduced and this effect increases over the first three weeks until complete sterility ensues in the fourth week (Bock and Jackson 1957). A similar situation is found in mice. Single doses of TEM reduce the fertility of the treated males during the first three weeks after injection. This effect, which is due to embryonic mortality, increases until the 10—14th day post injection after which time fertility is quickly recovered. Following a large dose of TEM, sterility is still evident at 6 weeks p.i., but this is due to the absence of spermatozoa (Cattanach and Edwards 1958). It is believed that the changes in the degree of effect during the first three weeks following treatment are the expression of the differential sensitivities of the various stages of spermatogenesis to damage by TEM. Thus Craig *et al.* (1958) suggest that the peak period of effect in rats at the fourth week p.i. is the result of interference with one of the later stages of spermatogenesis, and Cattanach and Edwards (1958) propose that the peak period in mice at 10—14 days p.i. is the result of treatment of the spermatids.

The increase in sterility in the two weeks following treatment suggests that TEM produces more genetical changes i.e. induces more dominant lethals in spermatids than in mature spermatozoa. In this paper, an experiment with mice to test this conclusion for translocations is described.

## Materials and Methods

The mice used came from a stock which was derived from four separate strains of mice *(JH, CRL, MS, RCL)* maintained by Dr. D. S. Falconer of this department. The method of treatment consisted of an intraperitoneal injection of a solution of 0.2 mg/kgm TEM made up with 0.9 per cent sodium chloride. This dose was lower than the doses used in previous experiments with mice. It was chosen because it allowed the later stages of spermatogenesis which are most sensitive to damage by TEM, to be utilized for the production of viable zygotes. The development of some embryos to birth throughout the early period of sterility was therefore possible.

Following treatment forty males were placed with five females each and left for three days. They were then removed until the ninth day p.i. when they were

again placed with five females, this time for four days. On each occasion the females were examined each morning for the presence of vaginal plugs (taken as evidence of mating) and those which had copulated were removed and replaced by new females.

The mated females were placed in separate cages and allowed to go to term when the litter-sizes were scored. All the offspring were reared until three weeks old, at which time the females were discarded, only the males being kept and subsequently tested. In all, 111 males were produced from litters conceived on the first three days following injection (Period I) and 74 from litters conceived on the tenth to thirteenth days p.i. (Period II). These animals were tested to see what proportion of them were heterozygous for a translocation. The method was similar to that described by Auerbach and Slyzinski (1956) and Cattanach (1957). The fertility of the males was determined by mating each one with several females (2—5). Those males which sired litters containing an average of less than nine offspring were suspected of semi-sterility and were examined cytologically for the presence of a translocation by the method described by Slyzinski (Auerbach and Slyzinski 1956; Falconer, Slyzinski and Auerbach 1952). The existence of nine-teen instead of twenty separate elements seen in at least eight metaphase plates of the first meiotic division served as an indication of the presence of a translocation. Note was also taken of the sperm heads in the cytological preparations in order to see if any of the animals possessed abnormal spermatozoa or lacked spermatozoa as had been observed in a previous experiment with a larger dose (Cattanach 1957).

In the $F_1$ litters, where both sexes were reared until three weeks old, the young mice were regularly examined for the existence or development of any obvious morphological abnormalities.

## Results

Table 1 shows the number of offspring born, living or dead, and the average litter sizes of the treated males in both groups. Details of the stock animals of the same generation are given as a control. Even with the low dose of TEM used the fertility of the treated males seemed to be slightly reduced in the three days following injection; thus the average litter size in Period I was 6.2 compared with 8.5 in the controls. This difference is probably less than it appears as no estimate of the number of sterile matings among the controls is known. By the tenth to thirteenth days, however, the effect of the drug was very much more obvious, the average litter size in Period II being only 2.4. The fertility of the males thus decreased by a factor of 2.6 from Period I to Period II.

Table 2 records the number of semi-sterile $F_1$ males which proved to be heterozygous for a translocation. One male carried two different translocations, and these have been scored separately. There was a marked increase in the frequency of semi-sterile animals from early to late litters. Thus 4.51% of the males in Period I were heterozygous for a translocation compared with 14.86% in Period II, an increase by a factor of 3.3. Examination of the sperm heads in the cytological preparations showed that most of the males had produced normal

spermatozoa. A few, however, produced a proportion of spermatozoa with heads of abnormal shape.

Table 2 also shows the number of sterile $F_1$ males. It can be seen that the frequency of occurrence of these animals closely parallels that of the semi-sterile males. This may suggest that the mechanisms by which the TEM causes sterility in the $F_1$ may be similar to that by which it induces translocations in the semi-sterile animals i.e. chromosome breakage followed by reunion.

On cytological examination one of the sterile males proved to be heterozygous for a translocation. The others could be separated into two groups; those in which meiotic metaphases could be observed, and those in which none could be found. 3 out of the 4 sterile males in Period I, and 6 out of 11 in Period II possessed apparently normal metaphases. In the remaining animals meiosis did not proceed very far, if indeed there were any meiotic cells at all, for the testes of some animals were strikingly small.

*Table 1*

| Period | Days after injection of males | No. of ♀♀ Mated | No. of ♀♀ Producing Litters | No. of Offspring | Average Litter size of all ♀♀ |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 1 | 20 | 17 | 126 | 6.3 |
| | 2 | 10 | 8 | 53 | 5.3 |
| | 3 | 7 | 7 | 51 | 7.28 |
| | Total 1—3 | 37 | 32 | 230 | 6.22 |
| II | 10 | 14 | 7 | 24 | 1.7 |
| | 11 | 11 | 8 | 22 | 2.0 |
| | 12 | 20 | 12 | 32 | 1.6 |
| | 13 | 20 | 17 | 78 | 3.55 |
| | Total 10—13 | 65 | 44 | 756 | 2.4 |
| Control | | | 69 | 585 | 8.48 |

The fertility of females mated to males treated with 1 dose of 0.2 mg/kg TEM.

The examination of the cytological material for sperm heads revealed that spermatozoa were not always present. As one would expect, where no metaphases had been observed, spermatozoa were not found, but this happened also in several males which did possess metaphases. Of the males which produced spermatozoa, a few were found in which many

Table 2. *Analysis of the $F_1$ generation following breeding tests and cytological examination*

| Period | Days conceived after injection of fathers | No. of F. males | No. semi-sterile | No. sterile | No. translocations | % translocations | % semi-sterile and sterile |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 1—3 | 111 | 4 | 4 | 5* | 4.51 | 7.21 |
| II | 10—13 | 74 | 10 | 12 | 11** | 14.86 | 28.39 |

* One semi-sterile animal was heterozygous for two separate translocations.
** One sterile animal was heterozygous for a translocation.

sperm heads were grossly abnormal in shape. Most of the sperm heads of the remaining males were normal, but there were also a few abnormally shaped ones. It is however doubtful whether the proportion of these was higher than that found in untreated animals. It would appear that there was a gradation of sterility among the sterile animals from those which possessed no metaphases to those which produded a proportion of abnormal sperm.

Of all the animals in the $F_1$ generation only one, a female, was morphologically abnormal, but it did not breed.

## Discussion

The fertility of male mice treated with TEM decreases over the following two weeks and this is accompanied by an increase in the frequency of translocations among the $F_1$ offspring of these males.

Cattanach and Edwards (1958) have already described the effect of TEM on the fertility of male mice. They suggested that the sterile period up to 14 days p.i. is the result of the differential sensitivities of the various stages of spermatogenesis to treatment with TEM, such that more dominant lethals are produced in the later stages of spermatogenesis than in mature spermatozoa. The results of the experiments described in this paper are in agreement with this hypothesis.

The frequency of translocations among the $F_1$ individuals represents the proportion of viable eucentric rearrangements between chromosomes. It is reasonable to suppose that an equivalent proportion of non-viable aneucentric rearrangements will occur and will cause the death of $F_1$ embryos. Furthermore, single breaks and deficiencies will add to the number of dominant lethals. The translocation frequency among the $F_1$ of treated males should therefore increase as the proportion of domimant lethals increases i.e. the frequency should increase as the fertility of treated animals decreases.

The results shown in Tables 1 and 2 clearly provide support for this theory. With a decrease in the fertility from Period I with an average litter-size of 6.2 to Period II with an average litter-size of 2.4, the frequency of translocations among the $F_1$ increased from 4.51% to 14.86%. Thus, measuring the effectiveness of the drug in terms of translocation frequency leads to the same conclusion as measuring it in terms of dominant lethals (Cattanach and Edwards 1958), namely that spermatids are more sensitive to the mutagenic action of TEM than mature spermatozoa.

A similar experiment with X-rays has been described by Auerbach and Slyzinski (1956). Their results suggested that the frequency of translocations among the $F_1$ of male mice treated with 600r X-rays was greater in those animals conceived later in the presterile period than in those conceived earlier. They concluded that, as had been demonstrated for dominant lethals (Hertwig 1938), (Russell, Russell and Kimball 1954), the spermatids were more sensitive to damage by X-rays than mature spermatozoa. It would therefore appear that the stages of spermatogenesis most sensitive to damage by TEM are also those most sensitive to damage by X-rays.

Quantitatively, however, there seems to be a difference in the relative sensitivities of spermatozoa and spermatids to these two mutagenic agents. If, in Table 2 of Auerbach and Slyzinskis paper (1956), litters No. 1 and 2 are taken to correspond to Period I of the present experiments, and litters 6 and 7 to Period II, the translocation frequency is found to increase by a factor of approximately 2, as compared with over 3 in the experiments with TEM. Although the X-ray data are small the difference may well be real. In this case one would expect that the frequency of dominant lethals would also increase more steeply from Period I to II after treatment with TEM than after irradiation, and this agrees with the observations of Cattanach and Edwards (1958) on TEM-induced sterility.

In both Periods I and II the proportion of semi-sterile animals in the $F_1$ was closely paralleled by the proportion of completely sterile ones. This had already been noted by CATTANACH (1958) in a study of a smaller sample than the present one. The fact that the frequencies of sterile and semi-sterile animals are approximately the same suggests that the mechanism by which both types of abnormality arise may be similar. The presence of a translocation, which is the cause of semi-sterility, is due to chromosome breakage and reunion. It seems possible that breakage with reunion may cause sterility when it results in deficiencies for genes which are necessary for some stage of spermatogenesis.

The fact that abnormal-shaped sperm heads, which were frequent among the sperm of many of the sterile individuals, occurred also among sperm from semi-sterile males, although in lower proportions, provides further support for the idea that sterility and semi-sterility may be different expressions of the same phenomenon. A study of the sperm heads of such sterile and semi-sterile mice by a more suitable cytological technique might provide a more concrete basis for linking the two together.

The high frequency of completely sterile males in the $F_1$ of TEM-treated males may indicate a difference from X-rays where only 10% of the $F_1$ of males treated with 700r have been found to be sterile (RUSSELL 1954). AUERBACH and SLYZINSKI (1956) do not mention the occurrence of completely sterile animals among the $F_1$ of males irradiated with 600r. Treatment of male mice with Nitrogen Mustard, however, which induced only a low frequency of semi-sterile $F_1$ animals (FALCONER, SLYZINSKI and AUERBACH 1952) also produced some completely sterile ones. It is perhaps possible that chemicals, which tend to produce intrachromosomal rather than interchromosomal changes (SLIZYNSKA 1954), favour the occurrence of deficiencies rather than translocations.

## Summary

The low dose of 0.2 mg/kg TEM allows the production of viable zygotes from the most sensitive stage of spermatogenesis. The frequency of translocations among offspring conceived during this peak period of sterility at 10—14 days p.i. is greater than among those conceived earlier, so that as the fertility of the treated males decreases (i.e. the percentage of dominant lethals increases) the frequency of translocations among their offspring increases. The results provide presumptive evidence that the spermatids are more sensitive to the mutagenic action of TEM than are the mature spermatozoa. A comparison of the incidence of translocations induced by TEM with that induced by X-rays is made and the significance of the occurrence of sterile animals among the $F_1$ is discussed.

**Acknowledgments.** I am indebted to Dr. C. AUERBACH, F. R. S. for her constant help and criticism and to Professor C. H. WADDINGTON, F. R. S. for laboratory facilities. I gratefully akcnowledge the receipt of financial assistance from the Agricultural Research Council.

## References

AUERBACH, C., and B. M. SLYZINSKI: Sensitivity of the Mouse Testis to the mutagenic Action of X-rays. Nature (Lond.) **177**, 376 (1956). — BOCK, M., and H. JACKSON: The Action of Triethylenemelamine on the Fertility of Male Rats. Brit. J. Pharmacol. **12**, 6 (1957). — CATTANACH, B. M.: Induction of Translocations in Mice by Triethylene Melamine. Nature

(Lond.) **180**, 1364 (1957). — Cattanach, B. M., and R. G. Edwards: The Effects of Triethylenemelamine on the Fertility of Male Mice. Proc. roy. Soc. Edinb. Vol. LXVII, 54—64 (1958). — Craig, A. W., B. W. Fox and H. Jackson: Sensitivity of the Spermatogenic Process in the Rat to Radiominetic Drugs and X-rays. Nature (Lond.) **181**, 353 (1958). — Falconer, D. S., B. M. Slyzinski and C. Auerbach: Genetical Effects of Nitrogen Mustard in the House Mouse. J. Genet. **51**, 81 (1952). — Hertwig, P.: Unterschiede in der Entwicklungsfähigkeit von $F_1$ Mäusen nach Röntgen-Bestrahlung von Spermatogonien, fertigen und unfertigen Spermatozoen. Biol. Zbl. **58**, 273 (1938). — Jackson, H., and M. Bock: Effects of Triethylenemelamine on the Fertility of Rats. Nature (Lond.) **175**, 1037 (1955). — Russell, W. L.: Genetic Effects of Radiation in Mammals. Radiation Biology, 1 Chapt. 12, edited by A. Hollaender. New York: McGraw-Hill Comp. 1954. — Russell, W. L., L. B. Russell and A. W. Kimball: The Relative Effectiveness of Neutrons from a Nuclear Detonation and from a Cyclotron in inducing Dominant Lethals in the Mouse. Amer. Naturalist **89**, 269 (1954). — Slizinska, H.: Cytological Analysis of Formaldehyde Induced Chromosomal Changes in "Drosophila melanogaster". Proc. Roy. Soc. Edin. Vol. LXVI, 288—304 (1954).

B. M. Cattanach,
Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh,
Edinburgh/Schottland

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 7—28 (1959)

Department of Entomology and Economic Zoology University of Minnesota

# SELECTION OF DROSOPHILA MELANOGASTER FOR LENGTH OF LARVAL PERIOD*, **

By

PRESTON E. HUNTER

With 4 Figures in the Text

*(Eingegangen am 2. Oktober 1958)*

This paper is one of a series on the genetics and ethology of DDT-resistance in Drosophila and house flies conducted at the Department of Entomology of the University of Kansas.

The present paper is concerned with the results of a study in which *Drosophila melanogaster* Meigen was selected for fast and slow development in the larval stage. During the selection period assays were made to detect any changes in DDT tolerance in the selected lines, and in addition data were collected and analyzed for preadult mortality, length of pupal period, and sex ratio. A genetic analysis of the selected lines was also undertaken.

## Materials and Methods

Selection of *Drosophila melanogaster* for long and short larval period was started in the spring of 1952 and continued until the spring of 1956. The stock for this study was composed of four Drosophila strains (Canton-S, Oregon-R-C, Sweden-C, and Urbana-S) obtained in 1951 from the California Institute of Technology, Pasadena, California. These four strains were maintained as separate cultures at the University of Kansas for approximately two months, after which they were pooled through three generations of special crosses to produce a foundation stock called COSU-1. The COSU-1 stock was maintained by pooling offspring from six culture bottles each generation and making up six new culture bottles of approximately 50 pairs of flies in each bottle. The parent flies used in the present study were taken from the COSU-1 line approximately six months after the strains had been pooled.

The Drosophila lines for this study were selected by two-way mass selection. Each generation, as parents for the following generation, 20 to 22 pairs of flies were taken from the tail of a distribution of 200 flies or less in each of the selected lines. One line, referred to as LL, was selected for long larval period. In this line those flies having the longest larval period each generation were taken as parents for the following generation. The other line, referred to as SL, was selected for short larval period by using as parents for the following generation flies of the SL line having the shortest larval period. In attempting to prevent a high degree of inbreeding rigid control of selection intensity was lost; thus in each line the selection intensity varied with the population size for that generation.

A non-selected, CS line, from the same parental stock as the selected lines was maintained as a control. These flies were reared in the same manner as the SL and LL lines, except that the parents of each generation were chosen at random from the offspring of the previous generation.

---

* Contribution No. 1022 of the Department of Entomology, University of Kansas. These data are from a thesis submitted to the University of Kansas in partial fulfillment of the requirements of the degree of Ph. D. in Entomology.

** This investigation was supported by the Medical Research and Development Division of the Office of the Surgeon General, Department of the Army, under Contract No. DA-49-007-MD-358.

All three lines were reared simultaneously on identical batches of larval medium and in the same location in the laboratory; thus in a given generation the environmental conditions were, as nearly as possible, the same for all lines. Both the larvae and adults were kept in a constant temperature room of 25 $\pm$ 1° C. There was no direct control over relative humidity or illumination.

Except for DDT assays, all flies in the selection study were reared singly in one-dram shell vials (size: 15 $\times$ 45 mm.). Each vial was filled with a standard corn meal-molasses-agar-yeast medium to a height of approximately 10 mm. The larval medium was prepared in a single large pan, and the prescribed amount of the hot liquid medium was pipetted into each vial with an eye dropper. The vials were then stoppered with a cotton plug and refrigerated until used. Beginning with generation 8 one drop of live yeast suspension was added with an eye dropper to the solidified medium in each vial two to three hours before use.

For the first 18 generations the parent flies in each line were mated as single pairs chosen at random from the flies selected as parents for that generation. Beginning with the 19th generation of selection the mating system was altered by keeping each fly in its own separate vial until the youngest flies were one day old; then all parent flies of one line were put into a single large food vial where mating occurred.

After mating, all of the parent flies of one line were placed in a half-pint milk bottle. Into this bottle was also placed an oviposition strip, consisting of a piece of cardboard coated on one side with a charcoal-agar-banana medium (GOWEN and JOHNSON 1946) to which yeast had been added. Twelve to fifteen hours after the flies had been introduced into the milk bottle two hundred eggs were taken at random from the oviposition strip and transferred, one egg to a vial, with a dissecting needle.

After seeding it with an egg, each vial was numbered and placed in a rack. The vials were then checked three to four times daily under a binocular microscope, and the time of egg hatching, pupation, and adult emergence was recorded for the individual fly in each vial. With this information it was possible to determine the length of time required for development of the larval and pupal stages for each fly.

As it was not always possible to take readings at the desired time, hatching or pupation had already started in some cases before the first readings. In such cases corrections were made by graphically extending the truncated curves, assuming a normal distribution of hatching or pupation time. Estimates of the actual time of egg hatching or larval pupation were made from these graphs. Several checks using artificially truncated samples confirmed the validity of this method.

After generation 25 complete records on larval period were taken only every third generation, but selection was maintained every generation whenever possible. Occasionally throughout the study mortality in the immature stages resulted in too few adults to make selection feasible. At other times, poor estimates of the larval period of the previous generation did not provide a reliable basis for selection.

## Results

### *Response to Selection*

Aspects of response to selection for length of larval period have been reported in a previous paper (SOKAL and HUNTER 1958); a summary of the more pertinent parts will be given here.

The mean length of larval period for all three lines fluctuated considerably as is shown by Fig. 1. In spite of these fluctuations a significant difference ($P < 0.01$) could be demonstrated between the SL and LL lines in the second generation of selection and for all ensuing generations. Significant differences ($P < 0.01$) as shown in Fig. 2 can be demonstrated between the LL and CS lines in all but 10 generations scattered throughout the period of study. Similar differences were found between the SL and CS lines in all but two generations.

A least squares regression of the deviation $d_L$, where $d_L = \bar{x}_{LL} - \bar{x}_{CS}$, and $d_S = \bar{x}_{CS} - \bar{x}_{SL}$, on generations was not significant. A later analysis by Dr.

Robert R. Sokal, involving ordering tests of moving ten-generation segments of the deviations, revealed only three segments with statistically significant trends in the $d_L$ series while no significant trends were found in the $d_S$ series. No relation was found between trends in these segments and selection intensity.

Although selection was continued throughout the study, the above findings indicate that all of the response occurred in the first few generations. The

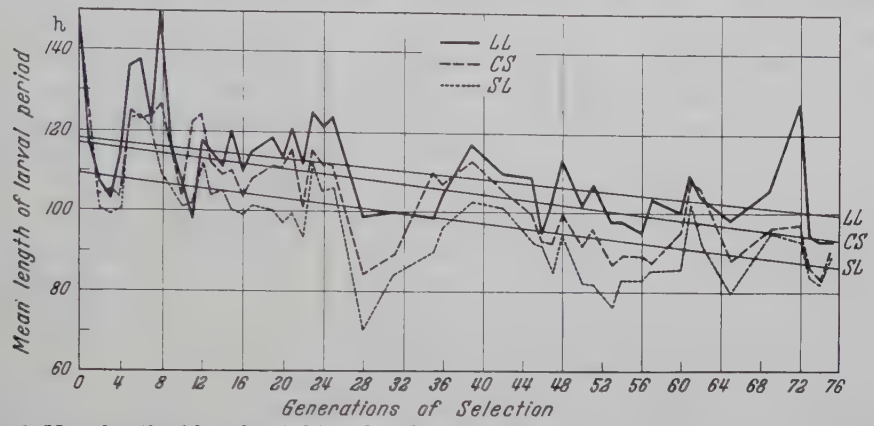



Fig. 1. Mean length of larval period for selected and control flies. The means of each of the three lines have been regressed on generation number and these regression lines have been included in the graph

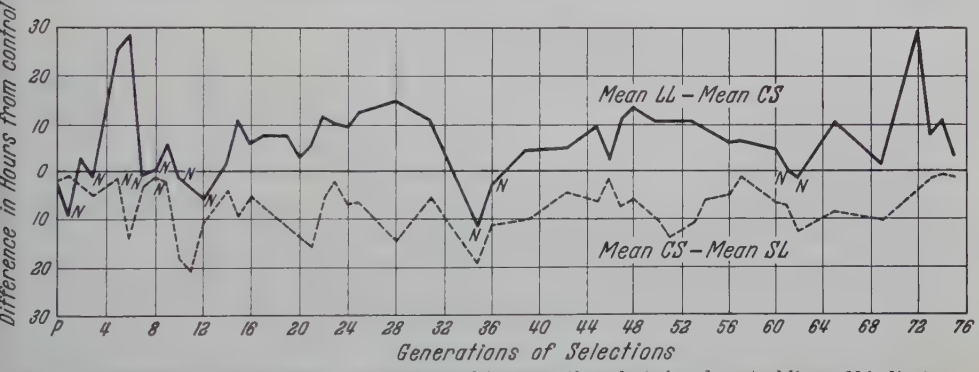



Fig. 2. Differences in mean length of larval period between the selected and control lines. *N* indicates generations at which the respective selected line was not significantly different from the control line

variations in the deviations of the selected lines from the control after the first few generations were apparently environmental. The fluctuations in all three lines occurred in a more or less parallel manner throughout the study.

The mean length of larval period of all three lines shows a consistent decline throughout the selection period (Fig. 1). Regression of mean length of larval period on generations of selection shows highly significant ($P < 0.01$) negative regressions for all three lines. The regression coefficients are as follows: LL —0.283, CS —0.366, and SL —0.350 hours per generation.

This decline in length of larval period may have been due to the method of egg collection in combination with a gradual shift in genetic composition of all three lines. Other workers — Robertson and Sang (1944), Gowen and

JOHNSON (1946), and HANSON and FERRIS (1929) — have found that the maximum egg production in Drosophila occurs during the first few days of adult life. In general flies having the shortest larval period will be among the first to emerge and those having the longest larval period will be among the last. Therefore, in most cases parent flies with the shortest larval period would be the oldest and most fecund at the time of egg collection; consequently a greater number of eggs would be taken from the parent females which had the shorter larval period in each line.

Support for the hypothesis of unconscious selection for short larval period can be found in the selection data. In the SL line both intentional and unintentional selection reinforce each other, and at no time during the study did the SL line have a mean larval period equal to or longer than that of the CS line (Fig. 2). On the other hand unconscious selection should tend to decrease the deviation of the LL from the CS line, and at eight different generations the LL line had a mean larval period equal to or less than the CS line. Furthermore, the slowest decline occurred in the LL line where selection for long larval period would tend to counteract the unintentional selection for short larval period.

*Fluctuations and Selection Limits*

Unconscious selection for short larval period did not, as would be expected, result in a greater response in the SL than in the LL line. This, plus the absence of a definite response to selection in either line after the first few generations, is believed due to the selected lines having reached a level which could not be surpassed under the experimental conditions employed.

Evidence of a response limit can be found in the selection data. The change from generation to generation in the selected lines would be due to the forces of selection plus environment; whereas, the variations in the CS line would represent the fluctuations occurring as a result of environmental forces only. Theoretically, from a regression formula based on the variations in the CS line, it should be possible to determine the change due to environment that would occur in the selected lines. Regression coefficients were calculated for $Y_S$ on $Y_C$ and $Y_L$ on $Y_C$ — where $Y_S$ is the change in mean length of larval period between successive generations of the SL line, $Y_C$ is the corresponding change in the CS line, and $Y_L$ the same for the LL line. The resulting estimates for environmental variation showed that the selected lines fluctuated above and below the levels expected from environment only. The very infrequent fluctuations of the selected lines beyond the level expected from the environment could be accounted for as response to selection. However, by far the more common situation was one where the change in the selected lines was less than that expected from the environment, a condition which could not be attributed to selection but could be explained under a selection limit hypothesis. If the length of the larval period of either selected line was already near the response limit an environmental factor acting in the same direction as selection could have only a small effect or no effect at all on the selected line. However, when environmental forces were opposed to and more powerful than selection, their effects could be fully or partially expressed. That such is actually the case is indicated by an analysis of the data which showed that, in general, for generations in which

the mean length of larval period of the CS line was longest the difference between the LL and CS lines decreased while the difference between the CS and SL lines increased. The reverse was true for generations in which the mean length of larval period of the CS line was shortest. Apparently, after the first few generations, fluctuations in the selection data were solely the results of environmental variations, and selection was effective only in so far as it kept the selected lines near the limit of their response.

The above hypothesis would be true only if all three lines responded equally to environmental effects. When the yeast concentration, air humidity above the vials, and rearing temperature were varied, there was some variation in the responses among the three lines (Figs. 3a—c), but in general parallel responses were found.

*Attempts to Control Fluctuations*

To facilitate interpretation, statistical and experimental procedures were undertaken in an attempt to remove some of the fluctuations in the length of larval period data.

Square root, log, and reciprocal transformations of the data did not reduce the fluctuations below that of the non-transformed data. Graphing of averages for segments of five generations showed a slightly clearer picture but did not remove an appreciable amount of the fluctuations. An attempt to remove that part of the fluctuation caused by environment by regressing $Y_L$ on $Y_C$ and $Y_S$ on $Y_C$ (described above) was also unsuccessful.

Sokal and Hunter (1958) have made further extensive statistical analysis of these and other data in an effort to deal quantitatively with fluctuations of this type but were only partially successful.

Experimental approaches were also used in an effort to determine if the source of these fluctuations was in the experimental technique employed. An experiment was set up in which readings were taken every two hours throughout the time of egg hatching and pupation for all lines for a single generation. These data were then rearranged to simulate readings taken for various intervals ranging from two to twelve readings a day. The mean length of larval period calculated for the various artificial readings did not vary more that two hours. Therefore, variations of the interval between readings was not a primary cause for the fluctuations from generation to generation of the mean length of larval period.

In an attempt to find environmental conditions which would produce fluctuations similar to those in the selection data rearing temperature, food, and air humidity above the rearing vials were varied in separate experiments for three consecutive generations. For each environmental factor studied the results of the three separate replicates were combined and are presented in Fig. 3a—c.

The methods employed for studying these environmental factors were as follows: the larval food was altered by adding different concentrations of yeast to the rearing vials two to three hours prior to use; the concentrations used are given in Fig. 3a; to adjust the air humidity over the vials during the larval and pupal stages, rearing vials were kept in desiccating jars containing potassium hydroxide dissolved in distilled water (see Peterson 1953, Table 15) in proportions to give relative humidities of 80, 61 and 39 percent — Fig. 3b; for the

temperature experiments the rearing vials were kept in constant temperature cabinets during the larval and pupal stages. The temperatures used are shown in Fig. 3c.

In these experiments the mean length of larval period varied from generation to generation in a manner similar to that of the selection data; however, in general the lines maintained their relative position to each other indicating a similar response to the environmental factors. Only under extreme conditions of rearing temperature and food supply was this relationship not maintained, and it is unlikely that such extreme conditions would have occurred during the selection study.

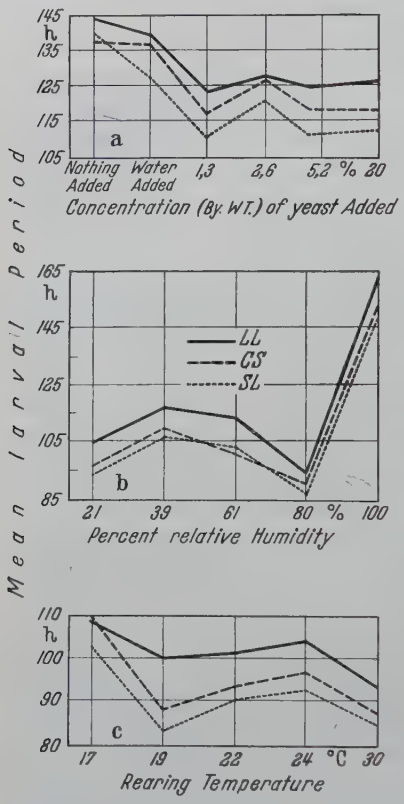



Fig. 3a—c. a Combined results from rearing lines with different yeast concentrations added to the rearing vials. Normal concentration of yeast at which lines were reared during selection was 1.3 %; b Combined results of experiments on rearing the selected and control lines at different humidities; c Combined results of rearing lines at different temperatures. Normal rearing temperature for selection was 24° C.

Although the fluctuations from generation to generation were not eliminated by controlling the above mentioned environmental factors, the effects of varying these factors themselves can be noted from the results of these experiments. Increasing the concentration of yeast in the larval medium above that normally used did not have a particularly noticeable effect upon length of larval period, Fig. 3a. However, there was a pronounced lengthening of the larval stage when the yeast suspension was replaced by the same amount of plain water and an even further increase in length of larval period in the selected, but not the control, lines when no water was added.

The relative humidity of the air in the rearing chamber had a conspicuous effect upon the length of the larval period, Fig. 3b. The fastest development occurred at 80% and the slowest development at 100% relative humidity. The largest difference in developmental time between the selected lines occurred at the lower humidities.

Lowering the rearing temperature below 19° C. lengthened the larval period although temperatures above 19° C. produced very little change in length of larval period, Fig. 3c. Only the CS line, which at 17° C. had a larval period slightly longer than that of the LL line, showed any great variation from parallelism of the lines with each other for the temperatures studied.

### *Variance*

Large fluctuations in the variance of the mean length of larval period occurred in all three lines. A regression of the variance on generations of selection showed no change in the variance of the CS and LL lines but a barely significant, negative

regression ($P < 0.05$) in the SL line. The exact cause for this decrease in variance in the SL line only is not known.

In most generations the LL line had the largest and the SL line the smallest variance although no statistically significant correlation between the variance and mean length of larval period was found for either of the selected lines. The lack of a correlation in the SL, which had a negative regression of both mean length of larval period and variance, could be due to the large fluctuations in both characters. No significant trend was found in any of the lines when the coefficient of variation was regressed on generations of selection.

### *Heritability*

Although different methods of estimating heritability are available in the literature, none are entirely suitable for measuring the heritability of a character subject to strong environmental fluctuations. In the work reported here it was possible to find generations showing heritability estimates of over 100% as well as other generations which gave negative values. Therefore, the estimates given here, based on the very early generations of selection where response must have occurred, should at best be regarded as approximations.

Although several different methods were tried, the heritability estimates included were calculated following FALCONER'S (1953) method. When the heritability for SL generations 1 to 11 and LL generations 1 to 6 was estimated by dividing total response by total selection applied, values of 24% and 42% were found for the SL and LL lines respectively. A second estimation for these same generations was obtained by dividing the regression coefficient of the deviations of the selected line from the control line, by the regression coefficient of the accumulative selection differential. This method gave values of 17% for the short and 70% for the long larval period line.

The discrepancy between the two methods may be due to two causes: a) the first estimate was based on only the first and last points of the generations included, while the second estimate was based on all points in that section of the selection response studied; and b) the second method may have over-estimated the heritability of long larval period because of a negative deviation in generations 1 and 3 (Fig. 2) giving a steeper slope to the regression line for the LL flies.

### *Miscellaneous Observations on Length of Larval Period*

Differences in the duration of the larval and pupal stages between male and female Drosophila have been found by various workers. BONNIER (1926) reported a slower larval development for male *Drosophila melanogaster* flies than for female flies, reared at 30° C. In strains studied for chromosomal effects LI (1927) found no difference in length of larval period in his normal line; however, he found that a strain of flies haploid for chromosome IV required two to three days longer to develop than diploid flies, the delay being especially evident in the larval stage.

BONNIER (1926), BLISS (1926), and LI (1927) have all reported that the pupal period of the female was shorter than that of the male in *Drosophila melanogaster*. In contrast to this MAYNARD SMITH and MAYNARD SMITH (1954) found that in

*Drosophila subobscura* the average emergence of the male flies was half a day before that of the female; however, it was not determined whether this difference in development was in the larval, pupal or both stages.

An analysis was made of the data for the present study to determine if the durations of the immature stages were the same for both sexes, especially in the lines selected for length of larval period. For both the selected lines and the control line the mean length of the larval and pupal period was computed separately for males and females for 18 generations arbitrarily chosen in more or less equal numbers from the first, middle, and last sections of the larval period study. There was no significant difference between the sexes in either of the selected lines or in the control line.

However, in both the selected and control lines the females always had the shorter pupal period, although the difference in hours between the sexes was not always statistically significant.

In contrast to adult emergence, which occurs chiefly in the early morning hours, it was noted that in all three lines pupation occurred uniformly throughout any 24 hour period. The process or processes which result in the predominance of adult emergence at specific times of the day must then have occurred in the pupal stage. PITTENDRIGH (1954) has shown this to be the case in his work with Drosophila where a time-clock effect based upon periods of illumination in the pupal stage governed the time of adult emergence.

## Correlated Responses

Throughout the study records were taken on DDT-resistance, preadult mortality, sex ratio, and pupal period to determine if changes had occurred in these characters during selection for length of larval period.

### *DDT-Resistance*

The effect of selection for length of larval period upon DDT-resistance has been reported in detail elsewhere (HUNTER 1956) and only a summary of this work will be included here.

Assays for DDT-resistance were made at the 28th, 29th, 39th, 46th, and 52nd generations of selection. The data were analyzed for each generation separately and also by pooling the data from all generations and treating them as a single assay. Comparison of the dosage-mortality-regression lines showed no significant difference between the CS and LL flies; however, the dosage-mortality-regression line for the SL flies was significantly steeper in slope than for either the CS or LL flies indicating a difference in reaction to DDT.

Based on $LD_{50}$ values, the SL line was more susceptible to DDT poisoning than either the CS or LL lines. No significant difference in DDT-resistance was found between the CS and LL lines.

### *Preadult Mortality*

The total preadult mortality was calculated as $100 - \frac{100 \times A}{E}$, where $E$ is the number of eggs placed in vials in one generation and $A$ is the number of adults emerging from $E$ eggs.

A regression of total preadult mortality on generations of selection showed an increase in preadult mortality in all three lines; however, this increase was greater in both selected lines.

The increase in preadult mortality was believed due to the effect of inbreeding in all three lines. As estimated by WRIGHT'S (1931) formula, inbreeding occurred at the rate of 1.25% per generation; however, this estimate is probably too low as it is based on the assumption that every parent female left offspring.

Under the experimental conditions of the study inbreeding was probably higher in the selected lines than the control line. This is borne out by the smaller regression coefficient in the CS line compared to the selected lines when preadult mortality was regressed on generations of selection (Table 1). In the selected lines if the offspring of one parent contained more than one fly phenotypically desirable as a parent for the following generation the probability of matings between related flies would be greater than in the control line where one fly was no more desirable than another.

Table 1. *Preadult mortality regressed on generations of selection*

| Line | Regression coefficient | Level of significance |
|---|---|---|
| SL | +0.305 | $P<0.001$ |
| CS | +0.260 | $P<0.05$ |
| LL | +0.458 | $P<0.001$ |

Table 2 shows the proportions of total preadult mortality due to egg, larval, and pupal mortality for each line for 50 generations combined.

Table 2. *Proportion of total preadult mortality occurring in the various stages of development*

| Line | Egg | Larval | Pupal |
|---|---|---|---|
| SL | 56.8% | 32.8% | 10.4% |
| CS | 67.0% | 25.3% | 7.7% |
| LL | 68.9% | 25.4% | 5.7% |

Decided fluctuations in egg mortality occurred throughout the study, but with no systematic trend for any of the lines. No significant correlations were found between egg mortality and selection intensity, magnitude of the fluctuations in length of larval period, or length of the larval period of the following generation. Highly significant negative correlations were found between egg mortality and mean length of larval period in each line; however, a comparison of egg mortality with selection response shows that throughout the study decreases in egg mortality did not result in renewed response to selection. It is believed that over the course of the study egg mortality increased due to inbreeding, while length of larval period decreased as a result of the selection system used. Hence, the two variables seem independent of each other with their correlation apparently a function of time.

When the pooled data for all generations were analyzed by a chi square test of independence, it was found that the LL line had a significantly higher egg mortality than either the SL or CS lines. No difference was found between the CS and SL lines.

The findings of other investigators indicate two factors which may have affected egg mortality in this study. Unintentional burying of the eggs in the yeast may have reduced egg viability (see CHIANG and HODSON 1950), and variation in the larval food may have affected the viability of the eggs laid as adults (see SANG 1950). However, as these effects would have occurred randomly, they should not have produced a greater effect in one line than in another.

No significant difference among the lines could be demonstrated by a chi square test of independence for larval or pupal mortality. Larval mortalities ranged from 8.6% for the LL to 6.5% for the CS line. Pupal mortalities ranged from 2.7% for the SL to 2.1% for the LL line.

In many generations there were some larvae, usually in the LL line, which remained small and never pupated. MCKENZIE and HOSKINS (1954) noted the same fact in selecting for early and late pupating house flies. The lack of adequate nutrition was apparently not an important factor in either study. One speculation for the cause of this condition might be that those larvae which failed to pupate were homozygous for a lethal genetic condition.

### *Sex Ratio*

Records of the adult sex ratio for each line were taken every generation for the first ten generations and thereafter at irregular intervals throughout the remainder of the selection study. The pertinent data for the sex ratio analysis are given in Table 3. These data were analyzed from two points of view, namely: a) deviations from a 50:50 sex ratio within lines; and b) differences in sex ratio between lines for each generation as well as for the entire study.

Table 3. *Total number of flies and the number of generations from which data were taken for sex ratio analysis*

| Line | Total number of flies | Number of generations | Total % females |
|---|---|---|---|
| SL | 3,330 | 27 | 53.1 |
| CS | 3,261 | 28 | 50.7 |
| LL | 2,856 | 26 | 49.7 |

Analysis by a chi square test showed that only the SL line had a significant deviation from a 50:50 sex ratio ($P < 0.001$ for pooled data). When analysis was made for differences in sex ratio between the selected lines, it was found that there were significantly fewer females in the LL than the SL line due primarily to the larger proportion of females to males in the SL line. No difference in sex ratio was found between the CS and LL lines or the CS and SL lines.

### *Pupal Period*

Pupal period was taken for the 22 different generations given in Fig. 4. As indicated by the reduced fluctuations, pupal period appears to be a more stable character than larval period.

A paired comparisons test using the non-parametric ranking method of WILCOXON (1949) showed that the LL line had a significantly ($P < 0.001$) longer pupal period than the CS line, while the SL line was not different from the latter. No consistent correlation was found between larval and pupal period within a generation.

The absence of any correlation between larval and pupal period is in agreement with the findings of NORTHROP (1917) and BAUMBERGER (1919). In contrast to this is the work of LI (1927) who found a negative correlation and ALPATOV (1930) who found a positive correlation between larval and pupal period.

The apparent lack of agreement among these reports may be due to an experimental rather than a biological cause. Environmental fluctuations in one or both developmental stages may have masked any correlation in the data; this may

be particularly true in the present work. Also rearing conditions, the strain of flies used, as well as the method of collecting the data differed in the various investigations.

None of the above investigators studied the correlation between larval and pupal period for a series of generations on a generation basis. In the present study a highly significant positive correlation was found when the mean length of pupal period was correlated with the mean length of larval period on a generation

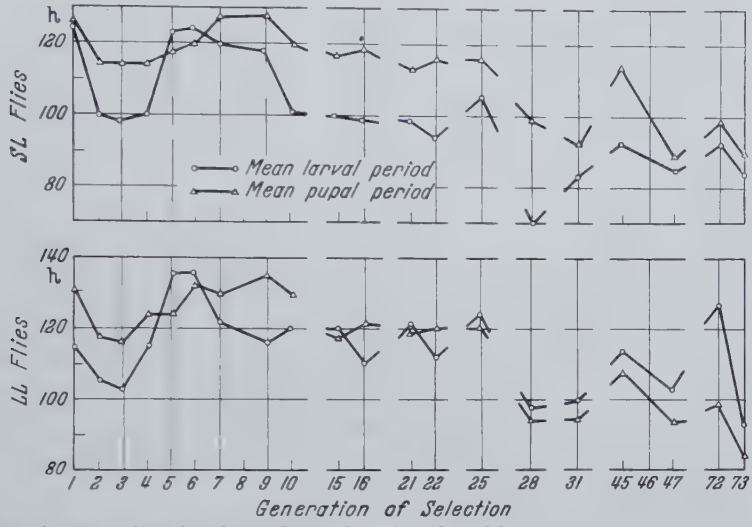



Fig. 4. Mean length of larval and pupal period of the selected lines for generations at which records were taken on both characters

rather than an individual fly basis. It would appear that in general the factors controlling the rate of growth in the larval stage were also effective in the pupal stage.

## Genetic Analysis of Selected Lines

Previous studies on the genetics of length of larval period have been limited to observations on the development of genetically different strains. Li (1927) reported that in *Drosophila melanogaster* haploid IV flies developed slower than diploid IV flies. Alpatov (1930) found that the length of larval period was slower in wild flies heterozygous for vestigial wing than homozygous vestigial winged flies. Recently Maynard Smith and Maynard Smith (1954) found that *Drosophila subobscura* flies heterozygous for certain mutants on chromosome V developed faster than homozygous flies, especially at higher temperatures.

### *Inbreeding Experiments*

An experiment involving inbred brother-sister lines, derived from the SL and LL lines, was carried out in an effort to gain some knowledge of the genetic factor(s) controlling length of larval period. From this experiment it was hoped to obtain information on the following points: a) Are the genes determining length of larval period in the selected lines in a homozygous condition, or could inbreeding combined with selection result in segregating lines at various

phenotypic levels? b) If the genotype is not fixed, could it be fixed by brother-sister matings—as shown by reduced phenotypic variance of length of larval period? c) Would it be possible by high selection intensity coupled with inbreeding to select beyond the limits of the SL and LL lines?

At the 45th generation of selection six brother-sister lines (designated by B) were started by single pair matings. Three of the six lines were from SL flies and the remaining three lines from LL flies. The origin of the inbred lines and their designations are given below.

B-SS — the male and female having the shortest larval period in the SL flies.
B-SM — a male and female of SL flies with a larval period the same as the mean of that generation.
B-SL — the male and female of SL flies having the longest larval period.
B-LS — the male and female of the LL flies having the shortest larval period.
B-LM — a male and female of LL flies with a larval period the same as the mean of that generation.
B-LL — the male and female of LL flies having the longest larval period.

Using the mating scheme in which flies in the inbred lines whose location in their own population distribution was the same as that of the original parental flies — i.e. shortest, longest, or median — successive generations were maintained by brother-sister mating of a single male and female. Forty eggs were taken from each parent female each generation and the surviving larvae reared to produce the next generation. In the later generations of selection fecundity was reduced in some lines to the extent that it was not always possible to obtain forty eggs. All inbred lines were reared simultaneously with and on identical larval medium as the SL, CS, and LL lines.

Because of extremely reduced fertility and fecundity in four of the lines, selection was halted after eight generations of inbreeding. The B-LM line had been lost by the fifth generation, and it had been necessary several times to relax selection in order to maintain some of the other lines.

Following the first experiment, a second experiment was carried out using this same method. The parent flies for the initial matings of this experiment were taken from the SL and LL flies of generation 56. This experiment was carried through only four generations, at which time the B-SS and B-SL lines had been lost because of infertility, and three of the four remaining lines were so low in fecundity and fertility that relaxation of selection was necessary.

In experiment I the average fertility of the generations 1 to 3 was higher than that of generations 5 to 8, except in the B-LL line. Of the six inbred lines, those selected for the extremes, i.e. selected for shortest or longest larval period, showed a lower average fertility than the two median lines.

Experiment II also showed a decline in fertility when the average of the first two generations was compared with the last generation. The average fertility of the lines in the second experiment does not show the same relationship between the lines as was found in the first experiment. The forced relaxation of selection, which occurred at different generations in each experiment, probably accounts for much of the difference in fertility between the two experiments.

Table 4 shows the mean length of larval period of each line for both experiments. Blanks in the table indicate generations at which there were too few offspring to yield a reliable mean and consequently selection was relaxed. The

Table 4. *Mean length of larval period with standard error (S. E.) and sample size (N) for inbred and selected lines. Blank spaces indicate generations at which records of length of larval period could not be taken*

| Gen. No. | Lines | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | B-SS | | | B-SM | | | B-SL | | | SL | | |
| | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N |
| | Experiment I | | | | | | | | | | | |
| 1 | 92.7 | 0.63 | 29 | 91.1 | 0.59 | 29 | 88.4 | 1.00 | 28 | 91.7 | 0.14 | 171 |
| 2 | 81.1 | 0.51 | 33 | 85.2 | 0.81 | 22 | 86.1 | 0.96 | 34 | 84.8 | 0.23 | 157 |
| 3 | 93.6 | 1.34 | 33 | 92.8 | 1.34 | 17 | 95.2 | 1.00 | 24 | 93.7 | 0.63 | 100 |
| 4 | — | — | — | 79.8 | 0.89 | 25 | 86.1 | 1.08 | 26 | — | — | — |
| 5 | 81.3 | 0.85 | 24 | 82.0 | 1.01 | 38 | 74.0 | 0.86 | 32 | 81.7 | 0.37 | 131 |
| 6 | 79.6 | 0.81 | 25 | — | — | — | 83.1 | 1.07 | 22 | 81.7 | 0.54 | 97 |
| 7 | 78.8 | 0.77 | 26 | — | — | — | 74.6 | 1.41 | 7 | — | — | — |
| 8 | — | — | — | 82.3 | 1.05 | 15 | 80.4 | 0.93 | 7 | 76.2 | 0.73 | 115 |
| | Experiment II | | | | | | | | | | | |
| 1 | 86.3 | 1.13 | 26 | 83.4 | 1.22 | 26 | 86.0 | 2.19 | 20 | 95.7 | 0.62 | 82 |
| 2 | 103.7 | 1.92 | 10 | 107.2 | 1.01 | 36 | 108.0 | 0.48 | 21 | 106.7 | 0.43 | 117 |
| 3 | — | — | — | 101.2 | 0.73 | 9 | — | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | 89.4 | 1.51 | 17 | — | — | — | 88.6 | 0.52 | 127 |

| Gen. No. | Lines | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | B-LS | | | B-LM | | | B-LL | | | LL | | |
| | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N | $\bar{x}$ | ±S. E. | N |
| | Experiment I | | | | | | | | | | | |
| 1 | 93.9 | 1.07 | 20 | 103.4 | 0.58 | 12 | — | — | — | 95.2 | 0.65 | 126 |
| 2 | 90.9 | 1.11 | 29 | 97.7 | 1.27 | 21 | 100.5 | 0.80 | 28 | 102.8 | 0.63 | 122 |
| 3 | 103.1 | 1.90 | 30 | 104.1 | 1.92 | 21 | 122.8 | 4.02 | 9 | 113.0 | 0.95 | 110 |
| 4 | — | — | — | 95.8 | 1.07 | 33 | 102.1 | 1.72 | 26 | — | — | — |
| 5 | 81.8 | 1.06 | 32 | — | — | — | 91.6 | 1.59 | 23 | 101.7 | 0.94 | 92 |
| 6 | 98.0 | 3.00 | 3 | — | — | — | 98.1 | 1.00 | 21 | 106.5 | 0.83 | 82 |
| 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 8 | 82.9 | 0.57 | 14 | — | — | — | — | — | — | 98.0 | 1.26 | 70 |
| | Experiment II | | | | | | | | | | | |
| 1 | 88.1 | 1.07 | 28 | 87.2 | 1.69 | 28 | 87.7 | 1.87 | 21 | 103.5 | 1.48 | 60 |
| 2 | 110.5 | 0.98 | 39 | 107.5 | 1.38 | 38 | — | — | — | 117.9 | 0.46 | 69 |
| 3 | 97.0 | 1.51 | 7 | 98.7 | 1.59 | 17 | — | — | — | — | — | — |
| 4 | 90.0 | 1.47 | 27 | 91.3 | 1.21 | 11 | 86.7 | 1.68 | 3 | 99.8 | 0.88 | 108 |

mean of the inbred lines fluctuated considerably from generation to generation and followed rather closely the fluctuations of the main experimental lines.

A comparison of the average mean length of larval period for the first three generations with the average of the last three generations shows a decline in the length of larval period for each line in the first experiment. However, a regression of the mean length of larval period on generations of selection showed no significant trend in length of larval period for any of the inbred lines. Also no change in length of larval period could be demonstrated by a similar regression in the experimental lines for the generations comparable to those of the inbred lines.

In these experiments it was not possible to select inbred lines beyond the limits of the main experimental lines, nor was it possible to show any decrease in the

coefficients of variation when the coefficients of variation were regressed on generations of selection. This lack of success in selection of the inbred lines in either direction is believed due to the genetic condition of the SL and LL lines. There had been sufficient time for the genes controlling larval period to become very stabilized if not fixed by the time parents were taken for the inbred lines.

Table 5. *Mean length of larval period with variance and sample size for crosses between the selected lines and for the selected lines reared simultaneously with the crosses*

| Crosses | First series of crosses, $F_1$ parents taken from generation 46 of selected lines | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean | Variance | N | Mean | Variance | N |
| | $F_1$ | | | $F_2$ | | |
| SL ♀ × LL ♂ | 84.7 | 19.07 | 95 | 94.3 | 39.67 | 86 |
| SL ♂ × LL ♀ | 88.5 | 33.57 | 59 | 100.7 | 82.95 | 93 |
| Selected lines | Generation corresponding to $F_1$ | | | Generation corresponding to $F_2$ | | |
| SL | 84.8 | 7.94 | 157 | 93.6 | 39.33 | 100 |
| LL | 102.8 | 47.72 | 122 | 113.0 | 101.45 | 110 |

| Crosses | Second series of crosses, $F_1$ parents taken from generation 49 of Selected lines | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean | Variance | N | Mean | Variance | N |
| | $F_1$ | | | $F_2$ | | |
| SL ♀ × LL ♂ | 82.8 | 33.48 | 86 | 87.8 | 48.24 | 84 |
| SL ♂ × LL ♀ | 86.2 | 55.47 | 63 | 101.6 | 119.67 | 76 |
| Selected lines | Generation corresponding to $F_1$ | | | Generation corresponding to $F_2$ | | |
| SL | 81.7 | 14.27 | 131 | 81.7 | 28.18 | 97 |
| LL | 101.7 | 80.50 | 92 | 106.5 | 57.95 | 82 |

| Crosses | Third series of crosses, $F_1$ parents taken from generation 72 of selected lines | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean | Variance | N | Mean | Variance | N |
| | $F_1$ | | | $F_2$ | | |
| SL ♀ × LL ♂ | 84.6 | 145.44 | 91 | 81.9 | 14.60 | 48 |
| SL ♂ × LL ♀ | 87.0 | 167.28 | 103 | 84.6 | 46.53 | 16 |
| Selected lines | Generation corresponding to $F_1$ | | | Generation corresponding to $F_2$ | | |
| SL | 80.4 | 43.03 | 60 | 82.6 | 25.72 | 54 |
| LL | 93.5 | 174.69 | 101 | 93.3 | 120.86 | 44 |

### *Chromosome Assay of Selected Lines*

A Drosophila stock[1] carrying the following commonly used markers was used as a tester strain for a chromosome analysis: Cy—curly wings; and Pm—plum eye color—both dominant on the second chromosome. Ubx—affects size and shape of halters; and Sb—stubble—both dominant on the third chromosome.

Two types of crosses were made for the LL line. In the first cross females of the marker strain were mated to males of the LL line and the resulting $F_1$ males backcrossed to LL females. In the second cross males from the marker strain were mated to LL females and $F_1$ males from this cross backcrossed to LL females. Virgin females were used in all matings.

Similar crosses were made for the SL and CS lines. Progeny flies with Sb and Pm markers were used in the assays; flies with Cy or Ubx markers were discarded. In each of the crosses four different genotypes could be distinguished by the segregation of Pm and Sb markers. In order to note any effect of homozygous

[1] Obtained through the courtesy of Dr. JAMES CROW, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

and heterozygous conditions of chromosome I, length of larval period was taken on females only. With the markers used it was not possible to assay the effect of the fourth chromosome.

Results from these assays showed that substitution of tester chromosomes shortened the length of larval period in all three lines. However, it was also noticed that in each assay the class which did not contain any tester chromosomes, i.e. the reconstituted stock, also had a larval period shorter than that of the main experimental line being assayed; therefore, the shortening effect was apparently not due to the presence of the tester chromosomes.

Comparing heterozygous chromosomes — one member of the chromosome pair from the tester line, the other from the assayed line — with homozygous chromosomes, i.e. both members of a chromosome pair from the assayed line, it was found that there was essentially no difference in length of larval period between these two conditions.

Table 6. *Mean length of larval period with variance and sample size for the selected lines and for backcrosses of $F_1$ flies to the selected lines. S refers to flies from the SL line; L refers to flies from the LL line*

| Backcross number | Types of matings | Mean | Variance | N |
|---|---|---|---|---|
| 1 | S ♀ × (S ♀ × L ♂) ♂ | 82.6 | 39.87 | 48 |
| 2 | S ♀ × (L ♀ × S ♂) ♂ | 82.8 | 38.67 | 55 |
| 3 | S ♂ × (S ♀ × L ♂) ♀ | 81.5 | 18.92 | 63 |
| 4 | S ♂ × (L ♀ × S ♂) ♀ | 82.6 | 31.40 | 31 |
| 5 | L ♀ × (S ♀ × L ♂) ♂ | 85.9 | 50.00 | 48 |
| 6 | L ♀ × (L ♀ × S ♂) ♂ | 85.2 | 100.31 | 49 |
| 7 | L ♂ × (S ♀ × L ♂) ♀ | 85.3 | 32.67 | 64 |
| 8 | L ♂ × (L ♀ × S ♂) ♀ | 83.1 | 85.70 | 44 |
| | Selected lines | | | |
| | SL | 82.6 | 25.72 | 54 |
| | LL | 93.3 | 49.70 | 44 |

In light of the variation found in the selection data it is difficult to base any definite interpretation on the results obtained from these assays. For the three chromosomes assayed, i.e. chromosomes I, II, and III, it does not appaer that one chromosome has a more pronounced effect than another upon length of larval period.

### *Crosses between Selected Lines*

Three series of crosses by single pair matings of virgin flies were made between flies of the selected lines at generations 46, 49, and 72. In each series approximately 30 male and 30 female flies from each selected line were mated, and offspring from these matings were carried through the first and second filial generations. Reciprocal crosses were made in each case.

The mean length of larval period for the three series of crosses as well as for the selected lines are given in Table 5. The results of these crosses show that: a) crosses in both the $F_1$ and $F_2$ generations have a mean length of larval period closer to that of the SL than LL line (this was true for a geometric as well as for the arithmetic mean); and b) reciprocal crosses show a difference in length of larval period. Except for the third series the difference between the crosses was statistically significant. When the difference in hours between crosses is divided by the total difference between the SL and LL lines, it can be shown that the $F_2$ means are proportionally farther apart than the $F_1$ means.

Although no noticeable difference in the curves of the frequency distribution was apparent, the variance of crosses of SL females to LL males was always smaller than the variance of the reciprocal crosses.

$F_1$ flies from the third series of crosses were backcrossed to both parental lines. The types of backcrosses made and the mean length of larval period of each type are given in Table 6. The results of the backcrosses are similar to the results of crosses between the selected lines, i.e. the mean length of larval period is more like the SL than the LL line. The progeny of $F_1$ flies backcrossed to SL flies had a shorter larval period and smaller variance than the progeny of comparable backcrosses to LL flies. The length of larval period in three of the four backcrosses to the LL line had a slightly bimodal frequency distribution.

The fertility of all crosses was always higher than the fertility of the selected lines. The fertility of the backcrosses was approximately the same or in some cases slightly less than that of the selected lines.

## Discussion

Very little can be stated with finality concerning the exact number of genes controlling length of larval period. The fact that 6 to 11 generations were required for the attainment of maximum response would imply that the genetic system involved consisted of more than a single gene. At the same time the response pattern indicates that this genetic system is probably made up of a rather small number of genes. These genes may be located on chromosome IV since no one chromosome of the three assayed showed a greater effect than another. Also, as mentioned above, LI has shown that under certain conditions genes on chromosome IV have an effect upon length of larval period.

The results given in Table 6 indicate that the gene(s) for short larval period are dominant over those for long larval period. The hypothesis for dominance of short larval period is supported by the larger variance and bimodal type frequency distributions found in the results of $F_1$ backcrosses to the LL as compared to the SL line. Only one type of offspring would result when $F_1$ flies are backcrossed to SL flies as all flies would have at least one half of each chromosome pair of the SL, dominant, type. Conversely, backcrosses to LL flies would produce two types of offspring for length of larval period, namely a dominant type similar to the SL line and a recessive type similar to the LL line; this would account for the larger variance and the more or less bimodal type frequency distribution in these backcrosses.

The differences found between the reciprocal crosses of the selected lines could result from two causes: a) the effect of modifying genes, or b) a maternal influence.

In the $F_1$ generation the chromosome composition of the two crosses would be the same except for the Y chromosome. Therefore, any modifying gene(s) which could produce the results found in the $F_1$ crosses would be on the Y chromosome. In this case the females from both types of $F_1$ crosses should have the same mean length of larval period, the difference occurring only in males. An analysis of the data showed that the larval periods of the females of the two types of crosses were not the same, nor were the females different from the males in length of larval period within the progeny of either cross. Thus it seems very

unlikely that modifying genes could produce the results found here; and it would, therefore, appear that the difference between the reciprocal crosses may be attributed to a maternal effect.

Unless the type of dominance involved is known, it cannot be ascertained from the data available whether both the SL and LL females or only one of these produced the maternal effect. If a condition of complete dominance existed, the maternal effect would be through the LL female. If incomplete dominance were involved, the maternal effect would probably be due to the SL females and the question of whether the LL females also exerted a maternal effect would remain open. Either type of dominance would account for the results obtained in the crosses and backcrosses, and there is no evidence from the data to choose one type over the other.

Another genetic condition which could account for the results of Table 6 would be one in which long and short larval period are controlled by non-allelic genes, those producing short larval period being epistatic over those producing long larval period. A maternal influence would still be involved.

The results of the work reported here have several points which may be compared with other quantitative selection studies. One such point is the fluctuation in the phenotypic response. Hollingsworth and Maynard Smith (1955), selecting an inbred line of *Drosophila subobscura*, for fast and slow development at a temperature of 20.0 to 21.1° C. in the preadult stage, reported generation to generation fluctuations which on the whole exceed those found here. The larger variation found by these workers might be due in part to the fact that they included the variation of both larval and pupal period in their measurements.

In contrast to this, McKenzie and Hoskins (1954) found very little fluctuation from generation to generation in selecting for early and late pupation in house flies at a temperature of 26.1° C.

In addition to the different species used, an important factor which may account for some of the differences in fluctuations in the studies just mentioned and the work reported here would be the differences in rearing temperature. Temperature experiments in the present study, as well as the work of Dexter (1914), Bliss (1926), Bonnier (1926), and Messenger and Flitters (1954), show a pronounced effect of temperature upon length of larval period.

Fluctuations may also be found in the phenotypic responses in several selection experiments for other quantitative characters in Drosophila and other experimental animals. In selection studies using *Drosophila melanogaster* Mather and Harrison (1949), and Robertson and Reeves (1952) found fluctuations comparable to those of the present study. Similar but less erratic fluctuations are shown in Falconer's studies (Falconer and Latyszewski 1952; Falconer 1953) with mice and in Castle's (1951) work with rats.

In the present work it was felt that essentially all response to selection occurred in the first few generations of selection. The work by Dunn and Charles (1937) with mice also shows a response pattern of this type. In a Drosophila line selected for long wings Robertson and Reeves (1952) found this type of response too; however, in a line selected for short wing length these same workers found essentially no response until after 16 generations of selection. On the

other hand, a gradual response over several generations of selection is shown in the work of McKENZIE and HOSKINS and also in the study by CASTLE.

One possible explanation for the different types of responses noted in these studies could be the number of genes affecting the character as well as any secondary effects of these genes upon other characters. In addition the effect of environment on the selected character would also be important.

One interesting aspect of a selection study, particularly a study of a quantitative character, is the total phenotypic response selection produces. When studying characters influenced by environment, it often becomes difficult to distinguish between cessation of response and environmental variations. Cessation of selection response may be due to the direct effect of genetic limits, environmental limits, or physiological limits. Indirectly selection may be limited by a combination of these types, for example physiological necessity (SOKAL and HUNTER 1954).

Direct genetic limits to selection would result from fixation of the genes which determine the character under study, which seems extremely unlikely, or from a loss of variance to the extent that further selection becomes impossible. A selection limit owing to the loss of genetic variance is exemplified by the work of FALCONER and KING (1953) in which selection for body size in a hybrid line of mice was possible although the two parental lines no longer responded to selection. From the heritability estimates made in the present study there is reason to believe that genetic variance sufficient for selection to occur was still present, and therefore the absence of further selection response would not be due to a direct genetic effect.

Environmental conditions may limit the expression of a character in which case selection is no longer effective. As a theoretical example of such a limiting factor HAMMOND (1947) cites the nutritional level of dairy cattle food where regardless of a cow's potential for milk production a nutritionally low diet results in low milk production which can not be improved by selection. Although the work of FALCONER and LATYSZEWSKI (1952) does not give experimental support of HAMMOND'S hypothesis, direct environmental limitations to selection might, nevertheless, be considered as a possibility. In the present study when environmental conditions of food, relative humidity, and rearing temperature were varied, the changes in the three lines, especially in the selected lines, were about equal which would rule out at least these environmental factors as causing a limiting effect to selection.

Selection would cease under conditions where a further increase in response is physiologically impossible for the organism. LERNER and DEMPSTER (1951) postulated that in their study of selection for egg production in chickens, response to selection had decreased owing to some birds approaching a physiological limit of one egg per day. Physiological limits for fast and slow larval development in Drosophila must exist; however, it would seem probable that these limits would not be equally different from the normal, but that with equal response the limit for fast development would be attained much sooner than the comparable limit for slow development. This seems understandable in view of the findings in this study showing that increasing the yeast concentration in the rearing medium above a certain level no longer tended to shorten the larval period of

the flies. The work of Loeb and Northrop (1917), who were unable to obtain any further acceleration of larval growth by raising the rearing temperature above 27.5° C., would also be in line with this view. On the other hand, larval period may be considerably prolonged as evidenced by the experiments on yeast concentration in the present work. This was also shown by Baumberger (1919), who was able to keep larvae alive for 28 days, after which pupation occurred, by controlling the nutritional level of the food. In view of this, it seems probable that the small but approximately equal response obtained in the present study would indicate that other factors were important as limiting causes.

The elimination of a direct limit to selection leaves the alternative that selection ceased as the result of an indirect effect which may be due to any number of causes. One such cause could be selection of an associated trait which produces an undesirable response in a phenotypically unrelated character, for example in cases where selection response is accompanied by an increase in offspring mortality such as reported by Lerner and Dempster (1951) and Mather and Harrison (1949). A quite similar situation is that reported by Robertson and Reeves (1952) who attributed the ineffectiveness of continued selection in one of their Drosophila lines to a genetic mechanism which produced equilibrium between the selection forces and the forces working against selection, i.e. the forces which tend to reduce the "total reproductive fitness" of the fly.

If an associated character which produced an adverse effect was essential to the survival and perpetuation of the organism, continued selection response would occur only if the organism could in some manner overcome this adverse effect. Both internal forces — undesirable genetic combinations — as well as external forces — environmental factors — could limit the degree of development of a condition physiologically necessary for selection to take place, and this in turn would limit the response of the desired character.

In the present work it was felt that selection was limited by forces, probably environmental, acting on another physiological trait which was in some way associated with length of larval period. The exact nature of this trait is not known. If larval growth were intimately tied up with other vitally important processes, the extent of selection would depend upon the variation available to the associated character. Thus, although the potential for fast or slow larval development is present, it could be released only at the expense of other important life processes, thereby, limiting the response to selection. Such a physiological limit would not be static, but like any other character, subject to variation so that all individuals in a population would not have the same limit. Furthermore, environmental changes might increase or decrease the variation of the associated trait making selection possible in some generations, but ineffective in others. For example, the mechanisms necessary for water conservation, if associated with a selected trait, would be a limiting factor to selection in a dry but not necessarily so in a moist environment.

## Summary

Selection of flies from a COSU-1 strain of *Drosophila melanogaster*, which had been produced at the University of Kansas by pooling four laboratory strains, resulted in a short larval period line (SL), and a long larval period line

(LL). A non selected (CS) line was maintained as a control. All flies were reared singly in one-dram shell vials containing corn meal-molasses-agar medium.

Although selection was practiced for some 75 generations, no apparent response to selection occurred after the first few generations of selection. The hypothesis is presented that the lack of response to further selection was due to the fact that length of larval period was in some manner associated with one or more physiological traits necessary for the existence of the fly; consequently, selection was limited by the variation available to the correlated trait. This hypothesis is discussed in view of the present findings as well as those of other selection studies.

During the selection study there was a gradual decrease in length of larval period for all three lines. This decline was attributed to the method of egg collection used throughout the experiment, which brought about an unconscious selection in the direction of short larval period.

The mean length of larval period fluctuated considerably from generation to generation apparently as a result of uncontrolled, and unknown, environmental variations. Controlling food, rearing temperature, and air humidity around the rearing vials did not appreciably reduce the magnitude of the fluctuations. Log, square root, and reciprocal transformations of the data did not reduce the fluctuations.

Although there was no pronounced difference in the amount of total response to selection, long larval period gave a slightly higher heritability estimate.

No consistent difference was found between the sexes in length of larval period. However, in all three lines the female flies had a shorter pupal period than the male flies. Pupation was found to occur uniformly through a given 24 hour period.

Selection of single-pair, brother-sister mated flies was made in an attempt to produce inbred lines of various phenotypic levels of length of larval period. The lack of success in selection was believed due to a highly stable genotype in the SL and LL lines at the time parents were taken for the inbreeding experiments.

Three series of crosses were made between the two selected lines and the resulting progeny were carried to the $F_2$ generation. $F_1$ flies of the last series were backcrossed to both selected lines. Evidence was found indicating that the gene(s) controlling short larval period show a phenotypic dominance over those for long larval period and that a maternal effect was perhaps involved. The exact type of dominance could not be determined, nor was it possible to ascertain whether the maternal effect was through the SL or LL females or through both.

A single experiment was carried out for each line to determine the effect on length of larval period of chromosomes I, II, and III, independently and in combinations. From the results of these experiments it was not possible to show a greater effect on length of larval period of one of these chromosomes over another. No assay of chromosome IV was made.

Selection for length of larval period resulted in the correlated responses which are summarized below:

1. Larvae of the selected and control lines were assayed for DDT-resistance at five separate generations of selection. The SL line had a steeper sloped dosage-mortality regression line and a lower $LD_{50}$ value than either the CS or LL lines. No significant difference in the slope of the dosage-mortality regression lines or in $LD_{50}$ values was found between the LL and CS lines.

2. An increase in total preadult mortality, most intense in the selected lines but noted in all three lines, was believed due to inbreeding. Egg mortality made up the largest and pupal mortality the smallest proportion of total preadult mortality.

3. A significantly higher proportion of females than males was found in the SL line. The CS and LL lines showed no significant deviation from a 50:50 sex ratio.

4. Length of pupal period was not correlated with length of larval period on an individual fly basis within a given generation; however, there was a significant correlation when mean length of pupal period was correlated with mean length of larval period on a generation basis.

## References

Alpatov, W. W.: Growth of larvae in wild *Drosophila melanogaster* and its mutant vestigal. J. exp. Zool. **56**, 63—71 (1930). — Baumberger, J. P.: A nutritive study of insects with special reference to microorganisms and their substrata. J. exp. Zool. **28**, 1—81 (1919). — Bliss, C. I.: Temperature characteristics for prepupal development in *Drosophila*. J. gen. Physiol. **9**, 467—495 (1926). — Bonnier, Gert: Temperature and time of development of the two sexes in *Drosophila*. Brit. J. exp. Biol. **4**, 186—195 (1926). — Castle, W. E.: Variations in the hooded pattern of rats, and a new allele of hooded. Genetics **36**, 245—266 (1951). — Chiang, H. C., and A. C. Hodson: An analytical study of population growth in *Drosophila melanogaster*. Ecolog. Monogr. **20**, 173—206 (1950). — Dexter, J. S.: The analysis of a case of continuous variation in Drosophila by a study of its linkage relations. Amer. Naturalist **48**, 712—758 (1914). — Dunn, L. C., and D. R. Chares: Studies on spotting patterns. I. Analysis of quantitative variations in the pied spotting of the house mouse. Genetics **22**, 14—42 (1937). — Falconer, D. S.: Selection for large and small size in mice. Genetics **51**, 470—501 (1953). — Falconer, D. S., and W. B. King: A study of selection limits in the mouse. J. Genet. **51**, 561—581 (1953). — Falconer, D. S., and M. Latyszewski: The environment in relation to selection for size in mice. J. Genet. **51**, 67—80 (1952). — Gowen, J. W., and L. E. Johnson: On the mechanism of heterosis I. Metabolic capacity of different races of *Drosophila melanogaster* for egg production. Amer. Naturalist **80**, 149 179 (1946). — Hammond, John: Animal breeding in relation to nutrition and environmental conditions. Biol. Rev. **22**, 195—213 (1947). — Hanson, F. B., and F. R. Ferris: A quantitative study of fecundity in *Drosophila melanogaster*. J. exp. Zool. **54**, 485—506 (1929). — Hollingsworth, M. J., and J. Maynard Smith: The effect of inbreeding on rate of development and on fertility in *Drosophila subobscura*. J. Genet. **53**, 295—314 (1955). Hunter, Preston E.: Length of larval period related to DDT-resistance in Drosophila. J. econ. Entomol. **49**, 671—675 (1956). — Lerner, M., and E. R. Dempster: Attenuation of genetic progress under continued selection in poultry. Heredity **5**, 75—94 (1951). — Li, Ju-Chi: The effect of chromosome aberrations on development in *Drosophila melanogaster*. Genetics **12**, 1—58 (1927). — Loeb, J., and J. H. Northrop: On the influence of food and temperature on the duration of life. J. biol. Chem. **32**, 103—121 (1917). — McKenzie, R. E., and W. M. Hoskins: Correlation between the length of the larval period of *Musca domestica* L. and resistance of adult flies to insecticides. J. econ. Entomol. **47**, 984—992 (1954). — Mather, K., and B. J. Harrison: The manifold effect of selection. Heredity **3**, 1—52, 131—162 (1949). — Maynard Smith, J., and S. Maynard Smith: Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. VIII. Heterozygosity, viability and rate of development. J. Genet. **52**, 152—164 (1954). — Messenger, P. S., and N. E. Flitters: Bioclimatic studies of three

species of fruit flies in Hawaii. J. econ. Entomol. **47**, 756—765 (1954). — Northrop, J. H.: The role of yeast in the nutrition of an insect (Drosophila). J. biol. Chem. **30**, 181—187 (1917b). — Peterson, Alvah: *Entomological Techniques*. Ann Arbor, Michigan: Edwards Bros. Inc. 1953, 367pp. — Pittendrigh, Colin S.: On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 1018—1029 (1954). — Robertson, F. W., and E. C. R. Reeve: Studies in quantitative inheritance. I. The effects of selection of wing and thorax length in *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **50**, 414—448 (1952). — Robertson, F. W., and J. H. Sang: The ecological determinants of population growth in a *Drosophila* culture. II. Circumstances affecting egg-viability. Proc. roy Soc. B **132**, 277—291 (1944). — Sang, J. H.: Population growth in *Drosophila* cultures. Biol. Rev. **25**, 188—219 (1950). — Sokal, R. R., and P. E. Hunter: Reciprocal selection for correlated quantitative characters. Science **119**, 649—651 (1954). — Environmentally caused fluctuations in quantitative characters of *Drosophila*. Proc. 10th Internat. Congr. Entomology Montreal (in press 1958). — Wilcoxon, Frank: Some rapid approximate statistical procedures. New York: American Cyanamid Company 1949, 16pp. — Wright, S.: Evolution in Mendelian populations. Genetics **16**, 97—157 (1931).

Dr. Preston E. Hunter,
University of Minnesota, St. Paul 1, Minnesota, USA

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 29—52 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

# DIE INCOMPATIBILITÄTSBEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEOGRAPHISCHEN RASSEN VON PODOSPORA ANSERINA (CES.) REHM.

## II. DIE WIRKUNGSWEISE DER SEMI-INCOMPATIBILITÄTS-GENE*

Von

KARL ESSER

Mit 10 Textabbildungen

*(Eingegangen am 20. September 1958)*

## I. Einleitung

Bei *Podospora* ist jeder + - und — -Wildstamm hermaphrodit. Er bildet männliche und weibliche Geschlechtsorgane. Sie heißen Spermogonien und Ascogone. Die in den Spermogonien gebildeten Spermatien (♂ Gameten) sind mit den Ascogonen vom gleichen Kreuzungstyp incompatibel *(bipolare Incompatibilität)*.

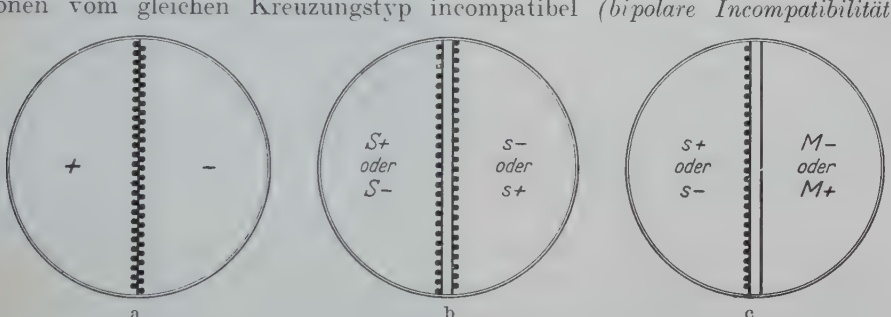



Abb. 1a—c. Schematische Darstellung der Fruchtkörperbildung zwischen Stämmen von *Podospora anserina*, die einen verschiedenen Kreuzungstyp (+, —) besitzen. Die Perithezien der beiden reziproken Kreuzungen sind bei normalem Kontakt vermischt (a), bei Barragebildung getrennt (b). Bei Vorliegen von Semi-Incompatibilität wird nur eine der beiden reziproken Kreuzungen realisiert (c)

Wenn man jedoch einen + - und einen — -Stamm in einer Petrischale aufeinander zuwachsen läßt, so vollziehen sich in der Berührungszone zu gleicher Zeit zwei reziproke Kreuzungen: ♀—×♂+; ♀+×♂—. Die makroskopisch erkennbare Linie von Fruchtkörpern in der Kontaktzone ist ein Gemisch der Perithezien beider Kreuzungen (Abb. 1a). In Kreuzungen zwischen geographischen Rassen (z. B.: $S \times s$) pigmentieren sich die Hyphenenden der Partner in der Berührungszone nicht. Es entsteht eine *Barrage* (RIZET 1952), in der sich keine Fruchtkörper bilden. Durch Barragebildung werden die Perithezien der beiden reziproken Kreuzungen getrennt (Abb. 1b).

Nach Kreuzung der Rassen *s* und *M* konnte beobachtet werden, daß sich nur eine der beiden reziproken Kreuzungen realisiert, obwohl beide Stämme funktionstüchtige männliche und weibliche Geschlechtsorgane besitzen. Diese Erscheinung wurde als *Semi-Incompatibilität* (SI) bezeichnet (RIZET und ESSER 1953). Es handelt sich dabei um eine nicht-reziproke Incompatibilität, die nur

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

zwischen genetisch verschiedenen Stämmen auftritt und stets mit Barragebildung verbunden ist (Abb. 1c).

Ausgehend von der Nachkommenschaft der Kreuzung $♀s \times ♂M$ (die reziproke Kreuzung ist incompatibel) konnte gezeigt werden, daß für die SI 2 Genmechanismen verantwortlich sind, von denen jeder aus 2 Allelenpaaren besteht. Plasmatische Faktoren konnten ausgeschlossen werden. Der erste der beiden Genmechanismen wird durch $a/a_1$, $b/b_1$ und der zweite durch $c/c_1$, $v/v_1$ bestimmt. Alle 4 Gene sind nicht gekoppelt. In der Kreuzung $ab \times a_1b_1$ kann nur der Elter *ab* Fruchtkörper bilden. Das gleiche trifft für den Elter *cv* in der Kreuzung $cv \times c_1v_1$ zu (s. Teil I der vorliegenden Arbeit, ESSER 1956a). Es war das Ziel mit Hilfe von entwicklungsgeschichtlichen und weiteren genetischen Untersuchungen, einen Einblick in die Wirkungsweise der SI-Gene zu gewinnen.

## II. Material und Methoden

Das *Pilzmaterial* und die *genetischen Versuchsmethoden* sind bereits in Teil I beschrieben worden. Falls es bei der Darstellung der Versuchsergebnisse zum Verständnis einzelner Experimente notwendig ist, wird unter Seitenangabe auf Teil I verwiesen. Da die Perithezien nur gebildet werden, wenn sich die Kreuzungspartner durch die Allele + und — unterscheiden, wird bei der Beschreibung der genetischen Experimente der Kreuzungstyp meist weggelassen. Dadurch ist in Mehrfaktorkreuzungen eine bessere Übersicht gegeben.

Bei den *entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen* der SI wurde jeweils ein Kreuzungspartner mit dem Gen $r_1$ markiert. Die $r_1$-Stämme bilden in der dünnen Agarschicht der Präparate keine Ascogone aus. Spermogonienstände entstehen an ihnen jedoch reichlicher als beim Wildstamm (ESSER 1956b). Auf Grund dieser Versuchsanordnung kann man die beiden reziproken Kreuzungen getrennt beobachten.

## III. Versuchsergebnisse

### *1. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen der Befruchtungsvorgänge in compatiblen und incompatiblen Kreuzungen*

Die weiblichen Geschlechtsorgane von *Podospora* besitzen eine Empfängnishyphe, die Trichogyne genannt wird. Die kugeligen Ascogone werden meist schon vor der Befruchtung von Hüllhyphen umwachsen und so zu Protoperithezien umgebildet. Aus der plektenchymatischen Hülle der Protoperithezien wachsen strahlenartig Hyphen aus, die als sekundäre Empfängnishyphen angesehen werden. Die männlichen Gameten sind die einkernigen, birnenförmigen Spermatien. Sie bilden sich endogen in Hyphenausstülpungen (Spermogonien), die meist in Ständen angeordnet sind. Sie verlassen die Spermogonien durch eine trichterartige Öffnung und bleiben an dieser als traubige Anhäufung haften. Nach der mit Hilfe der Trichogynen erfolgten Befruchtung der Ascogone durch die Spermatien entwickeln sich die Protoperithezien zu Perithezien. Eine asexuelle Vermehrung (Konidien usw.) gibt es bei *Podospora* nicht. *Die Geschlechtsverhältnisse sind also bei unserem Objekt sehr klar ausgeprägt* (Unters. von AMES 1932, 1934 und DODGE 1936).

Durch Lebendbeobachtung nach der Methode von ZICKLER (1952) und Auswertung gefärbter Präparate (*Giemsa*-Färbung nach ROMBAUT 1954), die in verschiedenen Entwicklungsstadien fixiert wurden, ergibt sich folgendes Bild vom Ablauf der Befruchtungsvorgänge:

**a) Kreuzungen zwischen +- und —-Stämmen.** Wenn eine Trichogyne in die Nähe von männlichen Geschlechtsorganen oder Spermatien vom entgegengesetzten Kreuzungstyp gelangt, wächst sie auf diese zu (Abb. 2a). Dabei kann sie ihre Wachstumsrichtung bis zu 180° verändern. Sobald die Trichogyne mit einem Spermatium in Kontakt geraten ist, stellt sie ihr Wachstum ein. Ihre Endzelle

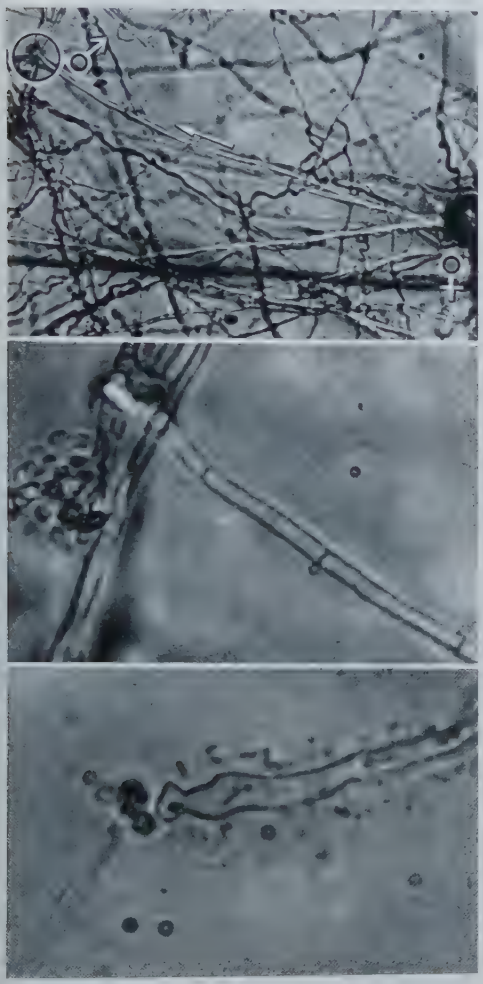
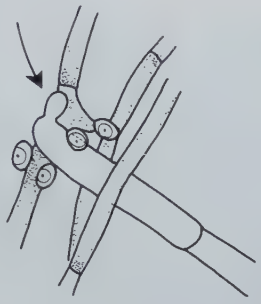


Abb. 2a—c. Befruchtungsstadien einer compatiblen Kreuzung zwischen einem +- und —-Stamm. Die Aufnahmen wurden vom lebenden Pilz angefertigt. a Übersichtsbild: Die Trichogyne eines Protoperitheziums (♀) ist auf Spermogonien mit anhaftenden Spermatien zugewachsen (♂) (Vergr. 360 ×). b Ausschnitt von a (Kreis): Die Trichogynenspitze hat mit einem Spermatium

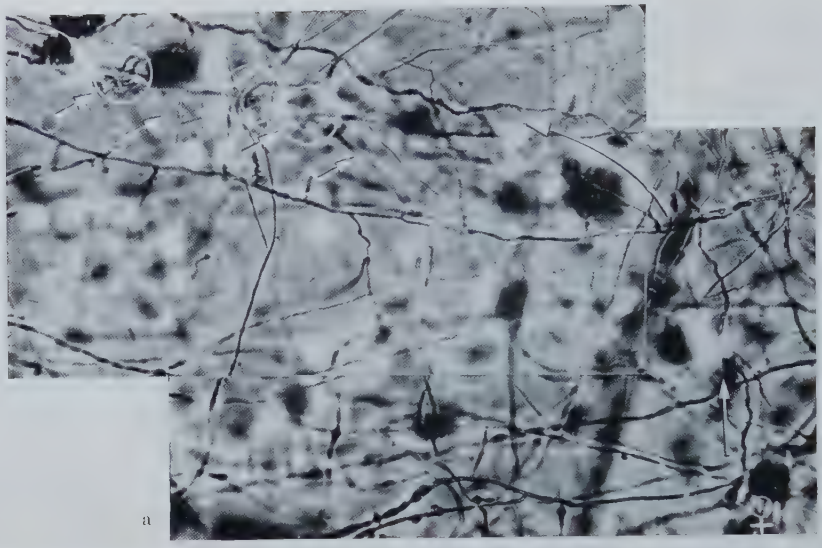


fusioniert. Das Spermatium ist kernleer. In den anderen Spermatien war der Nucleolus bei geringfügiger Variation der Mikrometerschraube zu erkennen (Zeichnung) (Vergr. Photo: 2160 ×; Zeichnung: 2400 ×). c Trichogynenspitze eines anderen Protoperitheziums, das mit einem Spermatium fusioniert hat. Der Kern des männlichen Gameten (kenntlich an seinem Nucleolus) ist noch nicht in die Trichogyne eingewandert (Vergr. 2400 ×)

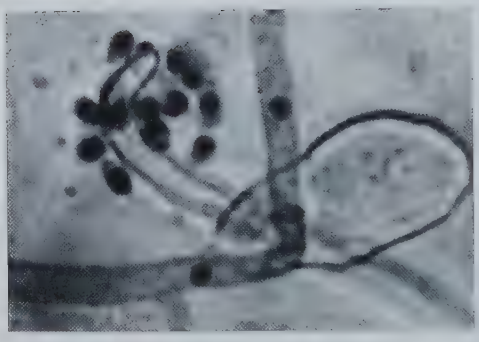
fusioniert mit dem Spermatium (Plasmogamie) (Abb. 2b). Die Trychogyne vakuolisiert sich, und ihre Kerne degenerieren durch Zerfall.

Bei den Lebendbeobachtungen ist der Kern kurz nach der Plasmogamie im Spermatium noch zu erkennen; der Nucleolus hebt sich als dunkler Punkt von dem in lebhafter Bewegung befindlichen Cytoplasma ab (Abb. 2c).

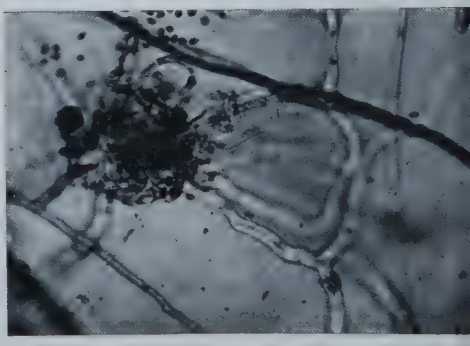
Der Kern des Spermatiums wandert durch die Trichogyne, deren Zellwände perforiert sind, in das einkernige Ascogon. Dieses entwickelt sich nach dem für die Ascomyceten bekannten Schema (dikaryotische Phase, Ascusbildung, Karyogamie, Meiosis) zum Perithezium.



a



b



c

Abb. 3a—c. Wachstum der Trichogyne in der incompatiblen Kreuzung ♀$a_1b_1 \times$ ♂$ab$. a Die Trichogyne eines Protoperitheziums (♀) ist unter Änderung ihrer Wuchsrichtung um etwa 90° auf Spermogonienstände zugewachsen. In der Nähe der Spermogonien hat sie 4 Verzweigungen ausgebildet, die mit ihren Enden verschiedene männliche Geschlechtsorgane aufgesucht haben (Kreise) (Lebendbeobachtung, Vergr. 176 ×). b Trichogynenspitze mit anhaftenden Spermatien. Eine Plasmogamie ist nicht erfolgt. Die Kerne der Spermatien sind infolge der Färbung deutlich zu erkennen (Vergr. 2880 ×). c Zwei Äste einer Trichogyne haben unter mehrfacher Verzweigung in einem Spermogonienstand ein „Trichogynen-Knäuel" gebildet. Zwei Seitenäste sind in verschiedenen Richtungen weiter gewachsen. Die Wuchsrichtung ist auf der Zeichnung durch Pfeile gekennzeichnet. In der Zeichnung sind die Spermatien weggelassen. Man kann auf diese Weise den Wachstumsverlauf der Trichogynenäste besser erkennen (gefärbtes Präparat, Vergr. Photo: 864 ×; Vergr. Zeichnung: 1300×)

Falls das Spermogon noch keine Spermatien entlassen hat, kann es auch selbst mit der Trichogyne fusionieren. Eine Verschmelzung von Trichogynenspitze und vegetativen Hyphen haben wir nicht feststellen können.

Nach unseren Beobachtungen kann eine Befruchtung der weiblichen Geschlechtsorgane nur mit Hilfe der Trichogyne erfolgen. Die Hyphen, die aus der Protoperithezienhülle auswachsen, können diese Funktion, die ihnen von Ames zugeschrieben wurde, nicht erfüllen.

Die Trichogynen wachsen nicht auf Spermatien vom gleichen Kreuzungstyp zu. Wenn sie zufällig auf diese treffen, erfolgt keine Plasmogamie.

Zickler (1952) untersuchte die Befruchtungsvorgänge bei einer 8sporigen *Podospora*-Art *(Bombardia lunata)*, deren Ablauf mit denen von *P. anserina* übereinstimmt. Er konnte durch physiologische Versuche nachweisen, daß die Trichogynen von den männlichen Geschlechtsorganen infolge einer Diffusion von Gamonen angelockt werden. Das Vorhandensein von Gamonen wurde bei *Podospora* nicht geprüft. Die Anlockung der Trichogynen spielt für die Realisation der Plasmogamie, die allein für uns von Interesse war, keine Rolle; eine Fusion erfolgt auch dann nicht, wenn unverträgliche Spermatien zufällig oder künstlich (Spermatisation) mit der Spitze der Trichogyne in Berührung kommen.

*Die bipolare Incompatibilität zwischen Geschlechtsorganen vom gleichen Kreuzungstyp beruht demnach auf der Unfähigkeit beider Organe, die Plasmogamie zu vollziehen.*

**b) Kreuzungen zwischen semi-incompatiblen Stämmen.** Wir untersuchten zunächst die semi-incompatible Kreuzung $ab \times a_1b_1$. In der *compatiblen* Kombination ($\varphi + ab \times \sigma - a_1b_1$; $\varphi - ab \times \sigma + a_1b_1$) wird die Plasmogamie nicht durch die SI-Gene beeinträchtigt. *Der Verlauf der Befruchtung entspricht der normalen Sexualreaktion zwischen + - und — -Stämmen.* In der *incompatiblen Kombination* ($\varphi + a_1b_1 \times \sigma - ab$; $\varphi - a_1b_1 \times \sigma + ab$) ist die durch den verschiedenen Kreuzungstyp der Partner bewirkte positive Affinität zwischen Trichogynen und Spermatien vorhanden. Die $a_1b_1$-Trichogynen wachsen wie in compatiblen Kreuzungen auf die männlichen Geschlechtsorgane zu (Abb. 3a) und legen sich mit ihrer Spitze an die Spermatien an. Eine Fusion konnte nicht beobachtet werden. Aus der Untersuchung gefärbter Präparate kann man entnehmen, (Abb. 3b) daß der männliche Kern nicht in die Trichogyne einwandern kann; leere Spermatienhüllen sind nicht zu sehen. Die Trichogynenspitze stellt in diesen incompatiblen Kreuzungen — im Gegensatz zu ihrem Verhalten in compatiblen Kreuzungen — ihr Wachstum nicht ein. Ihre Kerne degenerieren nicht. Sie wächst weiter und verzweigt sich, indem entweder die Endzelle oder eine der hinter ihr liegenden Zellen eine Seitenhyphe ausbildet. Der Seitenzweig sucht ebenfalls mit dem für Trichogynen typischen schlängelnden Wachstum andere Spermatien auf. Dieser Vorgang kann sich mehrmals wiederholen (Abb. 3a), bis das Wachstum der Trichogyne nach einigen Tagen schließlich sistiert. Ein Einwandern von Spermatienkernen konnte an keinem der Zweigenden beobachtet werden. Die Ausbildung von Seitenzweigen führt sehr oft in Spermogonienständen zur Entstehung von „Trichogynen-Knäueln" (Abb. 3c). Diese Beobachtungen erwecken den Eindruck, als ob trotz Anlockung der Trichogynenspitzen durch die Spermogonien eine negative Affinität nach erfolgtem Kontakt besteht, welche die Trichogyne zu weiterem Wachstum und zum Aufsuchen anderer Spermatien veranlaßt.

Die Untersuchung der Befruchtungsvorgänge zwischen den semi-incompatiblen *cv*- und $c_1v_1$-Stämmen führte zu den gleichen Ergebnissen.

*Die nicht-reziproke Incompatibilität zwischen Stämmen mit verschiedenem Kreuzungstyp ist also genau wie die bipolare Incompatibilität zwischen gleichen Kreuzungstypen durch ein Ausbleiben der Plasmogamie charakterisiert.* Der *Unterschied* zwischen beiden Incompatibilitätsmechanismen (s. Abb. 4) besteht darin, daß im ersten Falle *normalerweise kein Kontakt zwischen Trichogyne und Spermatiumeintritt, im zweiten Falle trotz mehrfachen Kontaktes kein Übertritt des männlichen Kerns in die Trichogyne erfolgt.* Die Bildung von zahlreichen

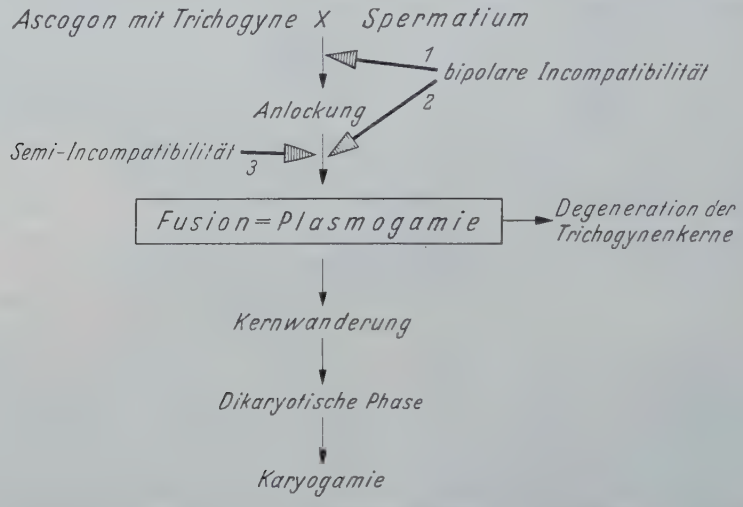



Abb. 4. Schematische Darstellung der Befruchtungsvorgänge in compatiblen und incompatiblen Kreuzungen von *P. anserina*. Bei bipolarer Incompatibilität zwischen genetisch gleichen Geschlechtsorganen (*1*) unterbleibt die Anlockung der Trichogynen durch die Spermogonien. Auch bei zufälligem Kontakt beider Organe erfolgt keine Plasmogamie (*2*). Bei Vorliegen von Semi-Incompatibilität zwischen genetisch verschiedenen Geschlechtsorganen wird der normale Ablauf der Befruchtung trotz erfolgter Anlockung der Trichogynen vor Eintritt der Plasmogamie blockiert (*3*)

Verzweigungen der Trichogyne kann als Reaktion auf die Unfähigkeit einer Fusion mit den Spermatien gedeutet werden, von denen sie immer aufs neue angelockt wird.

Die geschilderten entwicklungsgeschichtlichen Vorgänge haben die Wirkungen der SI-Gene in den Befruchtungsprozessen semi-incompatibler Kreuzungen aufgezeigt. Es ist vorläufig noch völlig unklar, welche inneren Bedingungen von den *ab*- bzw. $a_1b_1$-Genen im Plasma geschaffen werden und wie es dadurch zu den beobachteten Erscheinungen kommt. Wir versuchten daher durch andere genetische Versuche, der Wirkungsweise der SI-Gene näherzukommen. Dazu boten Anomalien, die regelmäßig unter den Nachkommen von si-Kreuzungen[1] auftraten, einen geeigneten Ansatzpunkt.

*2. Die genetische Analyse der Nachkommenschaften semi-incompatibler Kreuzungen*

**a) Die Analyse der $F_1$ von $ab \times a_1b_1$.** Aus der $F_1$ der Rassenkreuzung $s \times M$ wurden die homokaryotischen Stämme $s_1$ und $s_3$ isoliert, die im Kreuzungstest mit SI reagierten (Teil I, S. 602ff.). Unter den Nachkommen der Kreuzungen von $s_1$ und $s_3$ fanden wir verschiedene Genotypen, von denen drei nach der Keimung

[1] si-Kreuzungen = semi-incompatible Kreuzungen.

ein normales Wachstum zeigten und kreuzbar waren. Der 4. Typ bildete ein spärliches Myzelium aus und konnte nicht gekreuzt werden. Der Test der normal lebensfähigen Myzelien untereinander ergab, daß es sich dabei um die Eltern ($s_1$ und $s_3$) und einen Rekombinationstyp ($s_4$) handelte (Abb. 5).

| | | + | $ab$ | $a_1b_1$ | $ab_1$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | − | $s_1$ | $s_3$ | $s_4$ |
| $ab$ | $s_1$ | | | | |
| $a_1b_1$ | $s_3$ | | | | |
| $ab_1$ | $s_4$ | | | | |

Abb. 5. Testschema der normalwachsenden Myzelien aus der Kreuzung $s_1 \times s_3$. Die durch die Kreuzungsanalyse ermittelten Genotypen sind den Stammbezeichnungen zugefügt. Es bedeutet: ⩥ Barrage, ⟍ normaler Kontakt, ⋱ eine Linie Perithezien

Die genetische Konstitution der normal wachsenden Myzelien konnte durch Kreuzungsanalyse ermittelt werden. Wir fanden, daß sich die Eltern $s_1$ und $s_3$ durch 2 Gene unterscheiden ($s_1 = ab$, $s_3 = a_1b_1$), und der Rekombinationstyp $s_4$ den Genotyp $ab_1$ besitzt. Der Genotyp der vermindert lebensfähigen Myzelien (= l-Stämme) ließ sich aus der Kreuzungs- und Tetradenanalyse als $a_1b$ (=Rekombinationstyp Nr. 2) berechnen. Von diesen 4 Stämmen sind die 3 normal wachsenden bereits hinreichend charakterisiert worden (Teil I, S. 605ff.). Dagegen bedarf das Verhalten der $a_1b$-Myzelien, die außer ihrer verminderten Vitalität noch andere Anomalien zeigen, einer weiteren Beschreibung und Analyse.

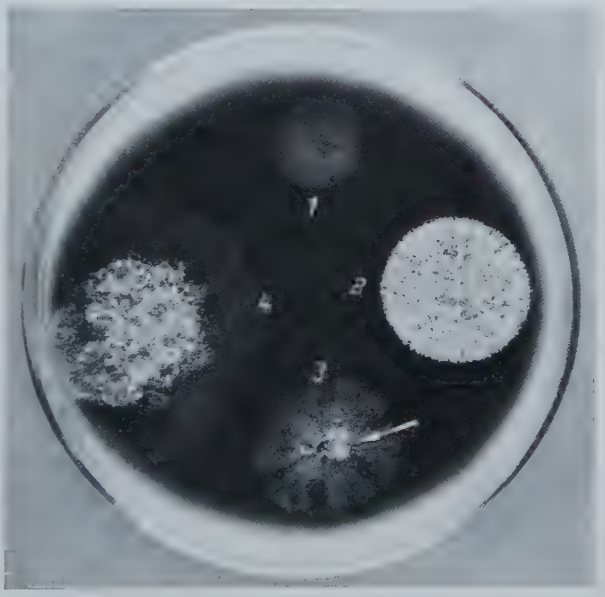


Abb. 6. Myzelien von *P. anserina*, die ein verschiedenes Alter besitzen. *1* $a_1b$-Stamm nach 48 Std; *2* gleichaltriger Stamm mit normalem Wachstum; *3* $a_1b$-Stamm nach 72 Std, in der Mitte der Kultur hat sich ein Zentrum normal wachsender Hyphen gebildet (Pfeil); *4* $a_1b$-Stamm nach 120 Std, die normal wachsenden Hyphen haben die vermindert lebensfähige Kultur teilweise überwuchert (Verkl. 1,3 ×)

α) *Wuchsverhalten der $a_1b$-Stämme.* Die $a_1b$-Stämme bilden im Vergleich zu normal wachsenden Genotypen nur ein zartes, hyphenarmes Myzel, das kein Lufthyphengeflecht aufweist (Abb. 6, *1* und *2*). Sie wachsen auf Pferdemist-Dekoktagar bei 26° C etwa 3,7 mm/d. Die tägliche Zuwachszone der Normalstämme liegt bei etwa 6,3 mm. Auch die mikroskopische Beobachtung zeigt sehr deutliche Unterschiede zwischen beiden Wuchsformen (Abb. 7). Die Normalstämme wachsen radial und bilden langgestreckte, vakuolisierte Zellen, die selten mehr als einen Kern enthalten. Die $a_1b$-Myzelien besitzen dagegen kurze, gedrungene, reich verzweigte Hyphen, deren meist mehrkernige Zellen nur geringfügig vakuolisiert sind. Sie enthalten viele abgestorbene, leere Zellen, die durch Degeneration der Zellkerne infolge Kernzerfall entstanden sind. Bevor die Kerne in mehrere

Bruchstücke zerfallen, strecken sie sich zu stabförmigen Gebilden (Abb. 7 rechts, Pfeile). Sogar in den Wuchszonen am Rande der Kulturen sind schon viele abgestorbene Zellen zu erkennen. In den normalen Myzelien existieren tote Zellen nur in alten Kulturen. Nach zweitägigem Überimpfen der Randzonen von $a_1b$-Kulturen verringert sich mit der 4.—5. Passage die Wuchsgeschwindigkeit bis zum völligen Eingehen der $a_1b$-Myzelien nach 20—40 Tagen. Normale Myzelien lassen sich unter den gleichen Bedingungen jedoch mehrere Monate (vereinzelt sogar mehrere Jahre) lang vegetativ vermehren (RIZET und MARCOU 1954). Es hat also den Anschein, als ob in den 1-Stämmen physiologische Vorgänge ablaufen, die ein vorzeitiges Absterben der Zellen bewirken.

Drei bis vier Tage nach der Sporenaussaat verändern die $a_1b$-Stämme ihren Habitus. In der Mitte der Kulturen entstehen Nester von wenigen Lufthyphen (Abb. 6, *3*). Am nächsten Tag hat sich die Zahl dieser Nester weiter zum Rande

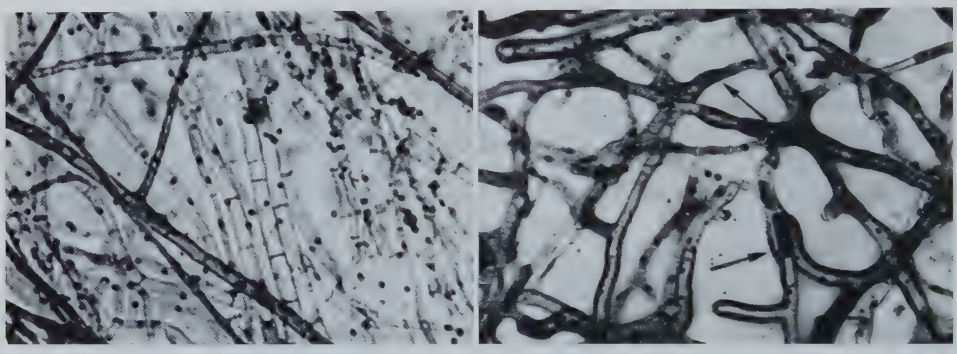


Abb. 7. Normale (links) und $a_1b$-Myzelien (rechts). Im rechten Bild weisen die Pfeile auf einen langgestreckten, degenerierten und einen bereits in Bruchstücke zerfallenen Kern hin. (Giemsa-Färbung, Vergr. 830 ×)

der Kultur hin vermehrt. Aus den älteren Nestern überwuchern Hyphen mit einer normalen Wachstumsgeschwindigkeit die $a_1b$-Kultur (Abb. 6, *4*). Nach etwa 7—8 Tagen ist das $a_1b$-Myzel bis zum Rande hin von normal wachsenden Lufthyphen bedeckt. Es wächst normal weiter.

Wenn man einzelne Lufthyphen aus den Nestern überimpft, entstehen Kulturen mit normalem Wachstum. Das gleiche geschieht auch nach Umsetzen von Myzelstücken aus überwucherten Kulturen. Die mikroskopische Beobachtung der normal wachsenden Hyphen aus $a_1b$-Stämmen zeigte keine Unterschiede mehr zu den übrigen normal wachsenden Stämmen. *Die Merkmale der $a_1b$-Stämme verlieren sich also bei längerer Kultur. Die normalisierten $a_1b$-Stämme bilden Geschlechtsorgane und sind untereinander und mit anderen Normalstämmen kreuzbar.* Sie können getestet und genetisch analysiert werden.

*β) Test und Kreuzungsanalyse der normalisierten $a_1b$-Stämme.* 416 $a_1b$-Myzelien aus einkernigen Sporen, die ihr Wachstum normalisiert hatten, wurden gemäß dem Schema der Abb. 5 getestet. *Ihr Verhalten war einheitlich.* Es konnten die folgenden Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen beobachtet werden: Normaler Kontakt und Compatibilität gegen *ab* und $ab_1$, Barrage und Semi-Incompatibilität gegen $a_1b_1$.

Bei Vorliegen von normalem Kontakt wurde die Compatibilität der beiden reziproken Kreuzungen entweder durch Spermatisierungen oder durch Markierungen der Tester mit den Barragegenen $t_1$ oder $u_1$, die keinen Einfluß auf die Compatibilität besitzen, ermittelt.

*Die normalisierten $a_1b$-Stämme reagierten* demnach mit den Testern in der gleichen Weise *wie der Elter ab*. Die Kreuzungsanalyse (Tabelle 1) zeigte, wie bereits kurz mitgeteilt wurde (Esser 1955), daß *diese phänotypische Identität auch genotypisch besteht,* denn in allen Kreuzungen verhielten sich die normalisierten $a_1b$-Stämme wie *ab*-Stämme. Man muß annehmen, daß *beim Übergang zu normalem Wachstum die $a_1b$-Stämme nach ab mutiert haben.*

Tabelle 1. *Die Ergebnisse der genetischen Analyse der $a_1b$-Stämme, die zu normalem Wachstum übergegangen sind*

Von jeder Kreuzung wurden mehrere Einzelkreuzungen durchgeführt, deren Resultate in der Tabelle zusammengefaßt sind. Die Kreuzungen Nr. 2—4 wiederholten wir in der für den Kreuzungstyp reziproken Kombination. Die Genotypen der einzelnen Nachkommenschaften ließen sich durch Test nach dem Schema der Abb. 5 bestimmen. Da meist Paare von Einzelsporen ausgesät wurden, erfolgte vor Anwendung des $\chi^2$-Testes eine Umrechnung der Spaltungszahlen (Teil I, S. 607).

| Nr. | Kreuzung | Sporenkeimung | | | Genotypen der $F_1$ () = Werte für den $\chi^2$-Test | | | | *P*-Wert des $\chi^2$-Testes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Anzahl der ausgesäten Sporen | normal lebensfähig | vermindert lebensfähig | *ab* | $a_1b_1$ | $ab_1$ | $a_1b$ | |
| 1 | $a_1b \times a_1b$ | 76 | 71 | — | 71 | — | — | — | — |
| 2 | $a_1b \times ab$ | 126 | 120 | — | 120 | — | — | — | — |
| 3 | $a_1b \times ab_1$ | 62 | 59 | — | 29 (12) | — | 30 (15) | — | 0,7—0,5 |
| 4 | $a_1b \times a_1b_1$ | 150 | 113 | 28 | 44 (18) | 36 (16) | 33 (16) | 28 (12) | 0,8—0,7 |

Die Kreuzungsversuche ergaben:

1. Wenn die Gene $a_1$ und *b* in einem Kern lokalisiert sind, entsteht ein vermindert lebensfähiges Myzelium.

2. Diese Wuchsanomalie verschwindet regelmäßig, sobald das Gen $a_1$ nach *a* mutiert hat.

Beide Phänomene beruhen offenbar auf einer *Unverträglichkeit der Gene $a_1$ und b im gleichen Kern,* denn die anderen Kombinationen der SI-Gene (*ab*, $a_1b_1$ und $ab_1$) bilden normal wachsende, stabile Myzelien. Es erhebt sich nun die Frage, wie sich diese Unverträglichkeit von $a_1$ und *b* im Heterokaryon auswirkt. In Heterokaryen können entweder $a_1b$-Kerne mit $ab_1$-, $a_1b_1$- oder $ab_1$-Kernen kombiniert oder die Faktoren $a_1$ und *b* in verschiedenen Kernen ($ab + a_1b_1$) lokalisiert sein.

*γ) Das Verhalten der Allelenpaare $a/a_1$ und $b/b_1$ im Heterokaryon.* Bei *Podospora anserina* sind die beiden Kerne einer Spore Nichtschwesterkerne der postmeiotischen Mitose (Rizet und Engelmann 1949, Franke 1957). Jede Spore enthält 2 der 4 Meiosisprodukte. Die beiden Sporen einer Ascushälfte sind identisch (Abb. 8).

In Kreuzungsasci entstehen daher heterokaryotische Sporen, wenn mindestens ein Genpaar postreduziert wird. In der $F_1$ der Kreuzung $ab \times a_1b_1$ befinden sich in 5 der 7 möglichen Ascustypen heterokaryotische Sporen (Abb. 9). Um das Verhalten der einzelnen Heterokaryen zu untersuchen, muß zunächst ihr Genotyp bestimmt werden. Dies geschieht durch Tetradenanalyse von gemischtsporigen

Asci, die statt einer zweikernigen zwei einkernige Sporen enthalten (Abb. 8b, c). Eine kurze Darstellung der Methode möge dies erläutern.

Ein Paar Einzelsporen, das mit jeder Spore ein Meiosisprodukt repräsentiert, gibt die genetische Konstitution seiner Ascushälfte an. Die in derselben Hälfte liegende zweikernige Spore enthält die gleichen Kerne. Wenn in jeder Ascushälfte ein Paar einkerniger Sporen gefunden wird (Abb. 8 c), kennt man nach Test der homocaryotischen Spore auch den Genotyp der beiden zweikernigen Sporen. Da diese Asci selten vorkommen (0,01—0,05%), muß man meist mit gemischtsporigen Asci arbeiten, die nur ein Paar Einzelsporen enthalten. (Häufigkeit 1—2%, Abb. 8b). Von diesen kann nur die Halbtetradenanalyse durchgeführt werden. Aus der Formel einer Halbtetrade (= 2 Meiosisprodukte) läßt sich in Verbindung mit der genetischen Formel der Eltern die Summenformel der anderen Halbtetrade berechnen. Der Genotyp der beiden fehlenden Meiosisprodukte kann nur eindeutig aus dieser Summenformel bestimmt werden, wenn $n$—1 der an der Kreuzung beteiligten Genpaare präreduziert wurden. Der Reduktionsmodus der in einer Aufspaltung vorhandenen Allele kann von den Genotypen der analysierten Halbtetrade abgelesen werden.

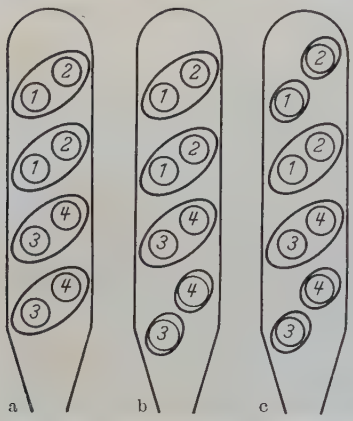



Abb. 8a—c. Schematische Darstellung der Verteilung der Meiosisprodukte in den Asci von *P. anserina*. Die 4 Meiosisprodukte sind durch Zahlen in den Kernen gekennzeichnet. a Normaler viersporiger Ascus; b gemischtsporiger Ascus, der an Stelle einer zweikernigen Spore zwei einkernige Sporen enthält; c gemischtsporiger Ascus mit 2 Paaren einkerniger Sporen

Im vorliegenden Falle sind die Ascustypen 4—7 durch die Halbtetradenanalyse der $F_1$ von $ab \times a_1b_1$ eindeutig zu bestimmen. Zum Beispiel: Ein Paar Einzelsporen mit den Genotypen $ab$, $ab_1$ zeigt, daß $a/a_1$ präreduziert und $b/b_1$ postreduziert ist. Die zweikernige Spore der gleichen Ascushälfte ist heterokaryotisch und enthält die gleichen Kerne. Die Meiosisprodukte der anderen Hälfte müssen demnach notwendigerweise $a_1b_1$ und $a_1b$ sein. Jede der beiden zweikernigen Sporen dieser Hälfte enthält diese beiden Kerne. Der Ascus kann dem Typ 5 zugeordnet werden (Abb. 9). Ein Paar Einzelsporen $ab$, $a_1b_1$ (beide Gene postreduziert) kann sowohl zum Ascustyp 1 als auch zu Typ 3 gehören. Bei Postreduktion beider Genpaare (Abb. 9, Asci Typ 1—3) muß der Genotyp der anderen Halbtetrade durch erneute Analyse von gemischtsporigen Asci aus der $F_1$ von zweikernigen Sporen dieser Ascushälfte ermittelt werden.

Das Allelenpaar +/—, das den Kreuzungstyp bestimmt, ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Tetradenanalyse der Heterokaryen. Da alle Kreuzungspartner für +/— heterogen sind, ist in jeder $F_1$ eine Aufspaltung dieser Faktoren vorhanden. Auf Grund der hohen Postreduktionsfrequenz (97%) von +/— sind die Kerne der zweikernigen Sporen meist durch + und — markiert. Aus ihnen entstehen selbstcompatible Myzelien. Bei Selbstincompatibilität muß man daher annehmen, daß eine Kernart eliminiert wurde.

Aus verschiedenen Kreuzungen zwischen $ab$- und $a_1b_1$-Stämmen konnten 423 gemischtsporige Asci zur Heterokaryonanalyse herangezogen werden. Die Unterteilung der Asci in 7 Typen (Abb. 9) erfolgte gemäß der oben beschriebenen Methode unter Verwendung des Test-Schemas (Abb. 5). Durch diese Klassifizierung waren die Genotypen der zweikernigen Sporen eindeutig bestimmt. Die Analyse der aus ihnen hervorgegangenen Myzelien, deren Kerne durch + und — markiert waren (409 Asci), ergab die folgenden Regelmäßigkeiten.

1. Heterokaryen, welche die normal lebensfähigen Kerne in den Kombinationen $ab + ab_1$ und $a_1b_1 + ab_1$ enthalten, sind selbstcompatibel (Ascustypen 4 und 5). Da niemals selbstincompatible Sektoren beobachtet werden konnten, darf man annehmen, daß sich beide Kernarten mit der gleichen Geschwindigkeit vermehren.

Diese Heterokaryentypen sind balanciert und verbleiben es auch bei längerer vegetativer Vermehrung.

2. Zweikernige Sporen, die einen der normal lebensfähigen Kerne ($ab$, $a_1b_1$, $ab_1$) und den vermindert lebensfähigen $a_1b$-Kern besitzen, keimen meist zu selbstincompatiblen Myzelien aus (Ascustypen 2—5).

In einigen Kulturen fanden wir jedoch in der Nähe der Sporenaussaatstelle wenige Perithezien. Die genetische Analyse von 12 dieser Fruchtkörper ergab, daß ihre Asci durch Karyogamie der normalen Kernart mit $a_1b$-Kernen (5) oder mit $ab$-Kernen (7) entstanden waren.

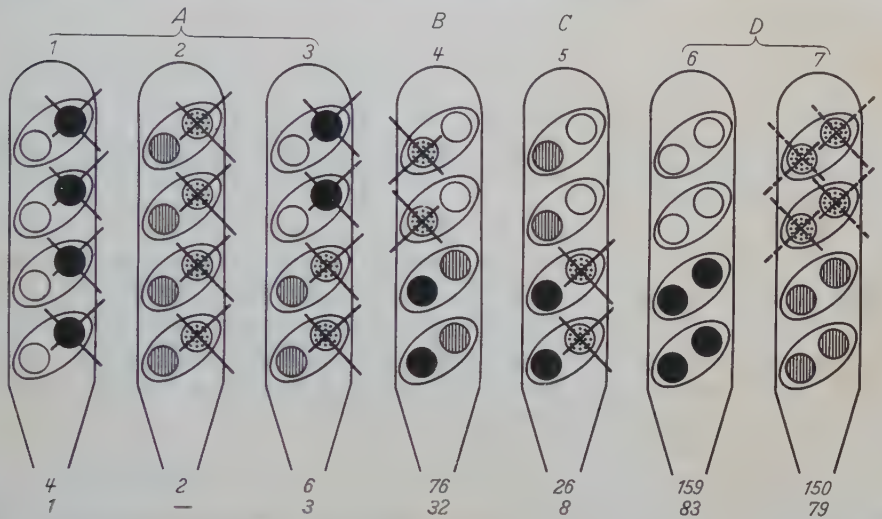



Abb. 9. Schematische Darstellung der möglichen Ascustypen aus der $F_1$ von $ab \times a_1b_1$. In Gruppe A (Asci 1—3) sind beide Genpaare postreduziert. Jeweils ein Genpaar ist postreduziert in den Gruppen B ($a/a_1$) und C ($b/b_1$) (Asci 4 und 5). Die Asci 6 und 7 der Gruppe D enthalten homokaryotische Sporen, da beide Genpaare präreduziert sind. Charakterisierung der Genotypen: $ab$ (weiß), $a_1b_1$ (schwarz), $a_1b$ (punktiert), $ab_1$ (schraffiert). Kerne, die im Heterokaryon eliminiert werden, sind durchkreuzt. Die mutabilen Kerne des Homokaryons $a_1b + a_1b$ (Ascus Nr. 7), sind gestrichelt durchkreuzt. Die Zahlenangaben unter den Ascustypen beziehen sich auf die Anzahl der analysierten gemischtsporigen (obere Reihe) und normalen Asci (untere Reihe)

Aus diesen Befunden kann man schließen, daß die $a_1b$-Kerne infolge ihrer geringen Teilungsfrequenz aus den Hyphen der Heterokaryen im Verlauf des Wachstums eliminiert werden. Sie bleiben in der Umgebung der Aussaatstelle zurück und mutieren vereinzelt nach $ab$. Aus den Heterokaryen sind selbstincompatible Homokaryen entstanden.

Interessant ist die Tatsache, daß auch $a_1b$-Kerne an der Fruchtkörperbildung beteiligt sein können. Wir vermuten, daß infolge der Anwesenheit der normalen Kernkomponente das Heterokaryon befähigt ist, einzelne $a_1b$-Geschlechtsorgane zu bilden. Die Homokaryen sind dazu infolge des Fehlens von Normalkernen nicht in der Lage. Ein ähnlicher Kompensationseffekt zwischen morphologischen Defektmutanten ist bei *Sordaria macrospora* bekannt (Esser und Straub 1956, 1958).

3. Myzelien, die aus $ab + a_1b_1$-Sporen entstehen (Ascustypen 1 und 3), bilden nur in der Nähe der Sporenaussaatstelle wenige Perithezien und teilweise kleine Barragestreifen. Die peripheren Zonen sind selbststeril und enthalten nur $ab$-Kerne, wie durch Test und Kreuzungsanalyse festgestellt werden konnte. Dadurch ist bewiesen, daß sich die $ab + a_1b_1$-Heterokaryen im Verlauf ihres Wachstums entmischt haben und zu $ab$-Homokaryen geworden sind.

4. Sporen, die zwei durch + und — markierte $a_1b$-Kerne enthalten (Ascustyp 7), bilden nach der Wachstumsnormalisierung Myzelien, die selbstincompatibel sind (etwa 50—60%) oder nur in Sektoren Perithezien tragen. Teste ergaben, daß diese Myzelien *ab*-Kerne enthielten. Man kann annehmen, daß die Kernkomponente, die zuerst nach *ab* mutiert, infolge ihrer höheren Teilungsrate mit ihren Hyphen die Kultur überwuchert. Selbstfertile Sektoren entstehen an Stellen, an denen beide Kernarten mutiert haben.

Die gleichen Regelmäßigkeiten im Verhalten der Heterokaryen konnten auch bei den 14 Asci (s. S. 38) gefunden werden, die für den Kreuzungstyp präreduziert waren. Da die Kerne dieser Sporen nicht durch + und — markiert waren, mußte ein vielleicht eingetretener Ausfall von Kernen im Heterokaryon durch Kreuzungsanalyse nachgeprüft werden. Man darf daher annehmen, daß das Verhalten der SI-Gene im Heterokaryon vom Kreuzungstyp unabhängig ist.

Nach Kenntnis der regelmäßigen Eliminierung von Kernen in bestimmten Heterokaryontypen (vgl. Abb. 9) können zur Tetradenanalyse der Kreuzung $ab \times a_1b_1$ auch normale Asci mit zweikernigen Sporen verwendet werden. Durch Test der meist selbststerilen Myzelien kann eine eindeutige Klassifizierung der Asci durchgeführt werden. Die Auswertung von 206 viersporigen Asci (Tabelle 9, untere Zahlenreihe) bestätigte die bisherigen Ergebnisse der Heterokaryonanalyse.

*Zusammenfassend* kann man sagen, daß *ein Heterokaryon nicht mehr stabil und balanciert ist, wenn es die Gene $a_1$ und b enthält.* Dabei spielt es keine Rolle, ob die beiden Gene in einem oder in verschiedenen Kernen lokalisiert sind. Im ersten Falle werden die $a_1b$-Kerne infolge ihrer verminderten Vitalität eliminiert. Im zweiten Falle setzen die *ab*-Kerne die Vermehrungsfähigkeit der $a_1b_1$-Kerne im gleichen Cytoplasma herab. Dieser Vorgang beruht auf einer *Unverträglichkeit von $a_1$ und b*, denn die beiden Heterokaryen $ab + ab_1$ und $a_1b_1 + ab_1$, die nur je einen der beiden Faktoren enthalten, sind stabil.

*Die Gene $a_1$ und b sind also nicht nur im gleichen Kern unverträglich* (verminderte Lebensfähigkeit der $a_1b$-Stämme), *sondern auch im gleichen Cytoplasma, wenn sie in verschiedenen Kernen lokalisiert sind.* Da stets die Kerne mit dem Gen $a_1$ negativ beeinflußt werden, kann man annehmen, daß diese Unverträglichkeit auf einer vom Gen *b* ausgehenden Wirkung beruht.

**b) Die Analyse der $F_1$ von $cv \times c_1v_1$.** Der zweite Semi-Incompatibilitätsmechanismus, der in der Rassenkreuzung $s \times M$ existiert, wird durch die Gene $c/c_1$ und $v/v_1$ bestimmt.

Da die Analyse der $F_1$ von $cv \times c_1v_1$ zu den gleichen Ergebnissen wie bei den Nachkommen aus der Kreuzung $ab \times a_1b_1$ führte, können diese Versuchsergebnisse summarisch beschrieben werden:

*Der Rekombinationstyp $c_1v$ ist vermindert lebensfähig* und besitzt den gleichen Phänotyp wie $a_1b$. Die $c_1v$-Stämme normalisieren ihr Wachstum ebenfalls nach 3—4 Tagen.

380 normalisierte $c_1v$-Myzelien aus einkernigen Sporen verhielten sich im Test (entsprechend dem Schema der Abb. 5) gegen die Eltern $cv$, $c_1v_1$ und den Rekombinationstyp $cv_1$ wie der Elter $cv$. Die Kreuzungsanalyse (Tabelle 2) ergab, daß normalisierte $c_1v$-Myzelien den Genotyp $cv$ besitzen.

Als Erklärung dieses Phänomens bleibt auch hier die Annahme einer *regelmäßigen Mutation von $c_1v$ nach cv.* Eine Mutation von $c_1v$ zu einem anderen Genotyp konnte nicht gefunden werden.

Zur Heterokaryenanalyse ließen sich 130 gemischtsporige Asci durch Test der Einzelsporen oder Kreuzungsanalyse der zweikernigen Sporen in die 7 mög-

Tabelle 2.

*Die Ergebnisse der genetischen Analyse der $c_1v$-Stämme, die ihr Wachstum normalisiert haben*

Zur Erklärung der Tabelle s. Legende von Tabelle 1.

| Nr. | Kreuzung | Sporenkeimung | | | Genotypen der $F_1$ () = Werte für den $\chi^2$-Test | | | | *P*-Wert des $\chi^2$-Testes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Anzahl der ausgesäten Sporen | normal lebensfähig | vermindert lebensfähig | $cv$ | $c_1v_1$ | $cv_1$ | $c_1v$ | |
| 1 | $c_1v \times c_1v$ | 52 | 48 | — | 48 | — | — | — | — |
| 2 | $c_1v \times cv$ | 48 | 45 | — | 45 | — | — | — | — |
| 3 | $c_1v \times cv_1$ | 68 | 64 | — | 27 (13) | — | 37 (19) | — | 0,3—0,2 |
| 4 | $c_1v \times c_1v_1$ | 100 | 78 | 18 | 24 (11) | 29 (13) | 25 (11) | 18 (9) | 0,9—0,8 |

lichen Ascustypen klassifizieren (Tabelle 3). Die Untersuchung der aus den zweikernigen Sporen entstandenen Myzelien hatte folgendes Ergebnis:

1. Die Heterokaryen $cv + cv_1$ und $c_1v_1 + cv_1$ sind balanciert (Ascustypen 4 und 5)

2. Die $c_1v$-Kerne werden in Heterokaryen mit $cv$, $c_1v_1$ oder $cv_1$ eliminiert (Ascustypen 2—5).

3. In Heterokaryen zwischen den Elternkernen $cv$ und $c_1v_1$ sind die $c_1v_1$-Kerne nicht lebensfähig (Ascustypen 1 und 3).

4. In durch + und — markierten $c_1v$-Homokaryen mutiert meist nur eine Kernart.

Es konnte also die gleiche Gesetzmäßigkeit im Verhalten der $c/c_1$- und $v/v_1$-Gene festgestellt werden wie bei den Faktoren $a/a_1$ und $b/b_1$.

Eine Veranschaulichung dieser Befunde ist in Abb. 9 gegeben. Es bedeutet: weiße Kerne ($cv$), schwarze ($c_1v_1$), punktierte ($c_1v$), schraffierte ($cv_1$).

Auch für die Gene $c_1$ und $v$ gilt danach: *Beide Faktoren sind miteinander unverträglich, wenn sie im gleichen Kern lokalisiert sind oder sich in verschiedenen Kernen eines Heterokaryons befinden.* $v$-Kerne setzen die Lebensfähigkeit von $c_1$-Kernen herab.

Tabelle 3. *Verteilung von 130 gemischtsporigen Asci aus der $F_1$ von $cv \times c_1v_1$ auf die vier Reduktionsgruppen und 7 Ascustypen*

Die Verteilung erfolgte nach Test der Einzelsporen bzw. Kreuzungsanalyse von zweikernigen Sporen gemäß den auf S. 38 beschriebenen Methoden.

| | Reduktionsgruppen | | | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D |
| Ascustypen | 1 2 3 | 4 | 5 | 6 7 |
| Anzahl | 6 9 19 | 60 | 14 | 12 10 |

Wachstumsstörungen, die durch die Genkombinationen $a_1/b$ und $c_1/v$ in den beiden untersuchten SI-Mechanismen hervorgerufen werden, sind spezifisch. $b$ und $c_1$ einerseits und $v$ und $a_1$ andererseits sind verträglich, denn die homokaryotischen Myzelien $a_1b_1cv$ und $abc_1v_1$ erweisen sich als stabil und normalwachsend.

Zwischen den beiden SI-Mechanismen besteht nur ein einziger Unterschied; beim $ab$-Mechanismus tritt die Barrage nur in Verbindung mit SI auf ($ab \times a_1b_1$). Beim $cv$-Mechanismus genügt schon die Heterogenität $v/v_1$ zur Barragebildung ($cv \times cv_1$), die jedoch mit reziproker Compatibilität verbunden ist.

**c) Die Analyse weiterer Rassenkreuzungen.** Im Verlauf der letzten Jahre konnten noch weitere Rassen von *Podospora anserina* isoliert werden, und zwar

von Pferdemist aus der Umgebung von Paris (Stämme *A*, *B*, *C*)[1], Heidelberg (Stamm *He*) und München (Stamm *Mu*). Homokaryotische +- und —-Myzelien von diesen Rassen haben wir untereinander und mit den bereits analysierten Rassen *s* und *M* gekreuzt. Ihre Kontakt- und Compatibilitätsbeziehungen, die mehrfach durch Spermatisierungen überprüft wurden, sind in Abb. 10 zusammengestellt.

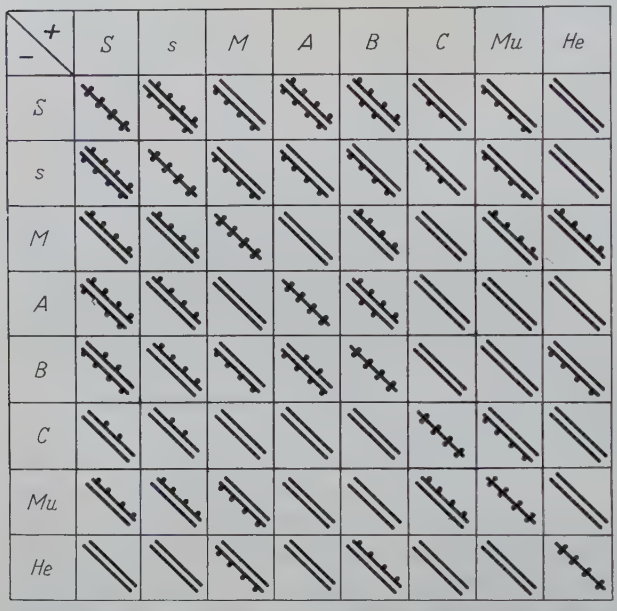



Abb. 10. Schematische Darstellung der Kontakt- und Compatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *P. anserina*. Es bedeutet: ⟍ normaler Kontakt, ⟍ Barrage, ⋱ normale Perithezienbildung, ⋰ reduzierte Perithezienbildung

Aus dem Schema der Abb. 10 ist zu ersehen:

1. +- und —- Stämme einer Rasse bilden normalen Kontakt und sind compatibel.

2. In Rassenkreuzungen entsteht stets eine Barrage.

a) Reziproke Compatibilität ist in 4 Fällen vorhanden. Sie ist nur in den Kreuzungen $S \times s$ und $S \times A$ normal ausgeprägt. In den anderen Kreuzungen ($S \times B$ und $A \times B$) ist die Fruchtkörperbildung von einer der reziproken Kreuzungen ($♀S \times ♂B$; $♀A \times ♂B$) merklich reduziert. Statt einer dichten Linie von Perithezien entlang der Barragezone werden nur vereinzelte Fruchtkörper gebildet.

b) Alle übrigen Kreuzungen sind entweder semi-incompatibel oder gänzlich incompatibel. Die Fertilität der si-Kreuzungen ist in 2 Kombinationen ebenfalls sehr gering ($S \times C$; $s \times C$).

Es erschien uns von Interesse zu prüfen, ob mit dem Auftreten von Semi-Incompatibilität in anderen Rassenkreuzungen die gleichen Erscheinungen verbunden sind, die in der $F_1$ von $s \times M$ als Unverträglichkeit bestimmter Gene festgestellt wurden. Von allen si-Kreuzungen (außer $s \times M$) wurden viersporige Asci ausgesät. Das Myzelwachstum und die Fruchtkörperbildung wurden beobachtet (Tabelle 4).

Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß unter den Nachkommen aller si-Kreuzungen Stämme mit verminderter Vitalität gefunden wurden. Sie ähnelten im Phänotyp den $a_1b$- und $c_1v$-Myzelien und normalisierten nach wenigen Tagen ihr Wachstum. Desgleichen entstanden regelmäßig Myzelien, die entweder selbstincompatibel waren oder nur an der Aussaatstelle wenige Perithezien bildeten. Dies läßt auf Eliminierung von Kernen im Heterokaryon schließen.

[1] Herrn Prof. Dr. G. RIZET danke ich für die Überlassung der Pilzkulturen.

Tabelle 4. *Analyse der $F_1$ semi-incompatibler Kreuzungen*

Das Wachstum der Myzelien wurde 2 Tage nach der Sporenkeimung registriert. Auf Kernausfall kann geschlossen werden: 1. wenn alle Myzelien eines Ascus selbstincompatibel sind und den gleichen Kreuzungstyp besitzen; 2. wenn aus einer Ascushälfte selbstincompatibel und aus der anderen selbstcompatible Myzelien hervorgehen.

| Kreuzung | Anzahl der Asci | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ausgesät | auswertbar | Alle Myzelien normalwüchsig und ohne Kernausfall | mindestens 2 Myzelien | |
| | | | | vermindert lebensfähig | mit Kernausfall |
| $S \times M$ | 50 | 50 | — | 30 | 50 |
| $S \times C$ | 35 | 34 | — | 18 | 34 |
| $s \times A$ | 70 | 62 | — | 43 | 21 |
| $s \times B$ | 50 | 45 | 16 | 21 | 29 |
| $s \times C$ | 50 | 36 | 6 | 19 | 30 |
| $M \times B$ | 50 | 39 | 9 | 8 | 30 |

*Da in der $F_1$ aller si-Kreuzungen die gleichen Phänomene aufgetreten sind, die unter den Nachkommen von $s \times M$ existieren, kann man annehmen, daß diese Gesetzmäßigkeiten auf dem gleichen Prinzip basieren: der Unverträglichkeit bestimmter Genkombinationen.* Diese Annahme wird noch bestärkt durch die Tatsache, daß in der $F_1$ reziprok compatibler Kreuzungen (z. B.: $S \times s$ und $S \times B$) niemals vermindert lebensfähige Myzelien gefunden wurden.

Eine genauere genetische Untersuchung der einzelnen Rassenkreuzungen müßte noch zeigen, ob deren Incompatibilitätserscheinungen von den gleichen Loci gesteuert werden, die bei *s* und *M* wirksam sind, oder ob dafür andere Gene verantwortlich sind.

### *3. Untersuchungen über die Mutabilität der vermindert lebensfähigen Myzelien*

Unter den Nachkommen semi-incompatibler Kreuzungspartner befanden sich stets Rekombinationstypen mit der geschilderten verminderten Lebensfähigkeit (= l-Stämme), die nach einiger Zeit ihr Wachstum normalisierten. Für die Genotypen $a_1 b$ und $c_1 v$ konnte nachgewiesen werden, daß der Übergang zum normalen Wachstum mit einer regelmäßigen mutativen Veränderung der Kerne nach *ab* bzw. *cv* verbunden ist. Dieses Phänomen bedarf einer genaueren Charakterisierung. Wie bereits erwähnt, ist die Mutation an der Bildung von Lufthyphen in der Mitte der Kultur zu erkennen. Da die radiale Wachstumsgeschwindigkeit der Normalhyphen etwa 6,3 mm/d beträgt (s. Tabelle 5), muß die mutative Veränderung erst wenige Stunden vor Sichtbarwerden der etwa 1 mm langen Luft-

Tabelle 5. *Die Abhängigkeit des radialen Myzelwachstums der normal wachsenden und der vermindert lebensfähigen Stämme von der Temperatur*

In den Wachstumsfunktionen bedeutet $x$ die Zeit in Stunden und $y$ der radiale Myzelzuwachs in Millimeter. Aus diesen Funktionen läßt sich der radiale Myzelzuwachs pro Tag berechnen (Einzelheiten s. Text).

| Genotypen | Temperatur in °C | Anzahl der Meßwerte | Wachstumsfunktion | Radialer Myzelzuwachs pro Tag in mm |
|---|---|---|---|---|
| *ab cv* | 26 | 860 | $y = 0{,}2614x - 3{,}07$ | 6,3 |
| $ab_1 cv_1$ | 18 | 271 | $y = 0{,}1819x + 3{,}26$ | 4,4 |
| $a_1 b_1 c_1 v_1$ | 10 | 140 | $y = 0{,}0754x + 0{,}26$ | 1,8 |
| $a_1 b$ | 26 | 395 | $y = 0{,}1526x - 1{,}36$ | 3,7 |
| $c_1 v$ | 18 | 451 | $y = 0{,}1178x - 0{,}87$ | 2,8 |
| | 10 | 224 | $y = 0{,}0440x + 0{,}67$ | 1,1 |

hyphen erfolgt sein. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich dabei um die Mutation eines oder mehrerer Kerne handelt. Bei weiterem Wachstum der vermindert lebensfähigen Myzelien entstehen laufend neue Nester von Lufthyphen (= Mutationszentren = MZ) zum Rande der Kultur hin. Die Mutation scheint sich mehrmals zu wiederholen. Das erste zentrale MZ kann beobachtet werden, wenn der Stamm einen Radius von 12—13 mm besitzt. Bei einer Temperatur von 26° wird diese Größe nach 3—4 Tagen erreicht. Da sich die Wachstumsgeschwindigkeit von *Podospora* bei Temperaturerniedrigung verringert (s. Tabelle 5), wird bei tieferen Temperaturen der kritische Myzelhalbmesser später erreicht.

*Experimentelles zu Tabelle 5.* In Parallelversuchen wurde die radiale Wachstumszunahme der normal wachsenden und der vermindert lebensfähigen Genotypen bei 26°, 18° und 10° C gemessen. Da die Variabilität innerhalb der beiden Wuchsklassen sehr gering war, konnten die Meßwerte für die einzelnen Temperaturen zusammengefaßt werden. Für die Messungen bei 26° und 18° wurden Sporen der entsprechenden Genotypen zur Zeit 0 ausgesät. Da bei 10° die Sporen sehr schlecht keimen, impften wir für die Wachstumsmessungen bei dieser Temperatur zur Zeit 0 Einzelhyphen über. Die Messungen erfolgten bei 26° alle 12 Std (bis 84 Std), bei 18° alle 24 Std (bis 120 Std) und bei 10° alle 48 Std (bis 14 Tage). Aus den Meßwerten wurden die Regressionslinien nach der Methode von MATHER (1955) berechnet. Da der Linearitätstest der Regressionslinien positiv ausfiel, ist sichergestellt, daß in den untersuchten Fällen der Halbmesser der Kulturen linear zunimmt. Aus den Regressionslinien konnten deshalb die Wachstumsfunktionen berechnet werden. Durch Substitution der Wachstumsfunktionen ließ sich der radiale Myzelzuwachs pro Tag ermitteln.

Es fragt sich nun, ob bei langsamerem Wachstum der l-Stämme die MZ entsprechend später gebildet werden. Von verschiedenen $a_1b$- und $c_1v$-Kulturen, die bei 26°, 18° und 10° C gehalten wurden, haben wir den Radius der Myzelien zum Zeitpunkt der Entstehung des ersten MZ gemessen. Auf Grund der geringen Variabilität der Meßwerte bei gleicher Temperatur konnten die Zahlenwerte für beide Genotypen zusammengefaßt werden (s. Tabelle 6). Es zeigte sich daß die Mittelwerte der Radien bei verschiedenen Temperaturen nicht verschieden sind. *Das Auftreten des ersten MZ ist demnach vom Alter der Kultur unabhängig.*

Tabelle 6. *Mittelwerte des Halbmessers von vermindert lebensfähigen Myzelien, die bei verschiedenen Temperaturen gehalten wurden, zum Zeitpunkt der Entstehung der ersten MZ*

| l-Stämme | Temperatur in °C | Anzahl der Meßwerte | Mittelwert in mm mit 3 mF |
|---|---|---|---|
| $a_1b$ | 26 | 383 | 12,6 ± 0,15 |
| $c_1v$ | 18 | 255 | 12,6 ± 0,19 |
| | 10 | 180 | 12,5 ± 0,23 |
| Aus der $F_1$ | 26 | 20 | 11,7 ± 0,73 |
| Von der $s \times A$ | 18 | 52 | 12,4 ± 0,48 |

Dies konnte noch durch einen weiteren Versuch bestätigt werden. 100 $a_1b$-Stämme wurden, nachdem sie einen Radius von 3—4 mm erreicht hatten, 2 Monate lang im Kühlschrank bei 4—6° C aufbewahrt. Nach dieser Zeit, in der sie 4—5 mm gewachsen waren, wurde aus jeder Kultur ein Myzelstück aus der Mitte und vom Rande entnommen, auf frischen Nährboden umgesetzt und bei 26° bebrütet. Alle Impfstücke vom Rande wuchsen zu vermindert lebensfähigen Myzelien aus. Die Impfstücke aus der Mitte ergaben 95 Myzelien mit verminderter Vitalität und 5 normalisierte. Es waren also nur 5% der Myzelien, deren Radius mit 7—9 mm unter der kritischen Länge lag, mutiert. Diese können als Minusabweicher angesehen werden.

Die Normalisierung der nicht-genetisch analysierten vermindert lebensfähigen Myzelien, die aus den übrigen si-Kreuzungen hervorgehen, beginnt ebenfalls in der Mitte der Kulturen mit einem Mutationszentrum. Die Untersuchung solcher Stämme aus der $F_1$ von $s \times A$ (Tabelle 6) zeigte, daß die Mutationszentren bei

gleichem Myzelhalbmesser entstehen wie bei den $a_1b$- und $c_1v$-Myzelien. Die Unabhängigkeit vom Alter der Kultur war auch dabei festzustellen.

*Die Entstehung eines Mutationszentrums* in vermindert lebensfähigen Rekombinationstypen aus si-Kreuzungen *ist* also *an das Vorhandensein einer bestimmten Myzelmenge*, d. h. einer bestimmten Kernzahl gebunden. Kernzählungen in gefärbten Präparaten ergaben, *daß Kulturen, in denen mit Beginn der ersten Mutation gerechnet werden kann* ($r = 10$ *mm*), etwa $10^6$—$10^7$ Kerne enthalten.

Dieser Wert gibt nur die Größenordnung der Kernzahl an, da die Zählungen infolge des unregelmäßigen Wachstums der Myzelien mit einem großen Fehler verbunden sind.

*Zusammenfassung der genetischen Untersuchungen:*

1. Die Erscheinung der Semi-Incompatibilität zeigt sich häufig zwischen Wildstämmen von *P. anserina*, die einen verschiedenen geographischen Ursprung haben.

2. In den beiden analysierten Fällen konnten in den Nachkommenschaften der einzig möglichen Kreuzungen ($♀ab \times ♂a_1b_1$; $♀cv \times ♂c_1v_1$) die gleichen Regelmäßigkeiten beobachtet werden, nämlich:

a) die Existenz von vermindert lebensfähigen Rekombinationstypen ($a_1b$; $c_1v$), die stets mutieren;

b) die Eliminierung der vermindert lebensfähigen Kerne im Heterokaryon mit normal lebensfähigen Kernen (z. B.: $a_1b + ab$);

c) die Herabsetzung der Vermehrungsfähigkeit von einer Kernart im Heterokaryon der beiden Elternkerne, in dem jede Kernart eines der beiden Gene trägt, die im Homokaryon die Lebensfähigkeit vermindern ($ab + a_1b_1$; $cv + c_1v_1$). Die in ihrer Vermehrungsfähigkeit negativ beeinflußte Kernart kann in Kreuzungen nicht als Weibchen fungieren.

3. Unter den Nachkommen der genetisch nicht näher untersuchten semiincompatiblen Kreuzungspartner wurden ebenfalls vermindert lebensfähige Rekombinationstypen gefunden, die ihr Wachstum normalisierten. Ferner konnte bei ihnen ein Ausfall von Kernen im Heterokaryon festgestellt werden.

Die genetische Analyse der Semi-Incompatibilität hat also folgende Gesetzmäßigkeiten aufgezeigt:

1. Bestimmte Kombinationen der SI-Gene sind sowohl in einem Kern (z. B. $a_1b$) als auch in verschiedenen Kernen ($ab + a_1b_1$), die sich im gleichen Cytoplasma befinden, unverträglich und führen Wachstumsstörungen herbei.

2. Von den beiden Partnern einer si-Kreuzung enthält jeder eine der beiden Kernarten, die im gleichen Cytoplasma unverträglich sind (z. B.: $ab \times a_1b_1$).

Es liegt daher die Annahme nahe, daß *diese Unverträglichkeit von Kernen ihren Ausdruck auch in dem als Semi-Incompatibilität bekannten Sexualverhalten findet.* Durch diese Befunde sind Ansatzpunkte für eine physiologische Untersuchung der SI und der mit ihr verbundenen Barragebildung gegeben, deren Ergebnisse an anderer Stelle mitgeteilt werden sollen.

## IV. Besprechung der Versuchsergebnisse

### *1. Die Auslösung von Incompatibilität bei Podospora anserina*

*Bei Podospora anserina kann die Fruchtkörperbildung der stets hermaphroditen Stämme durch zwei genetisch verschiedene Mechanismen unterdrückt werden,* und

zwar durch die bipolare Incompatibilität und die Semi-Incompatibilität. Beide blockieren die Plasmogamie zwischen dem weiblichen Rezeptionsorgan (Trichogyne) und dem männlichen Gameten (Spermatium). Die bipolare Incompatibilität zeigt sich zwischen den Geschlechtsorganen eines zwittrigen Stammes und zwischen Stämmen mit gleichem Kreuzungstyp ohne Rücksicht darauf, ob diese beiden in ihrer übrigen genetischen Ausrüstung identisch sind oder nicht ($+\times+$; $-\times-$). Die Semi-Incompatibilität kann dagegen nur bei Kreuzung heterogener Partner beobachtet werden, die sich durch den Kreuzungstyp ($+\times-$) und zwei weitere Gene ($ab\times a_1b_1$ bzw. $cv\times c_1v_1$) unterscheiden.

LEWIS (1954) erklärt die *bipolare Incompatibilität* der monözisch selbst incompatiblen Ascomyceten auf Grund der experimentellen Befunde mehrerer Autoren mit Hilfe des von den selbststerilen Blütenpflanzen her bekannten „complementary-stimulant" Mechanismus. Danach wird die *Compatibilität* zwischen +- und —-Geschlechtsorganen durch eine sich *ergänzende Wirkung von zwei verschiedenen Genprodukten* verursacht, von denen eines vom +- und das andere vom —-Kern ausgeht. Bei *Podospora* kann man annehmen, daß die +- und —-Genprodukte an der Kontaktstelle zwischen Trichogyne und Spermatium durch die Membran diffundieren, miteinander reagieren und durch ihr Reaktionsprodukt die Wandauflösung katalysieren. Die *Incompatibilität* zwischen genetisch gleichen Trichogynen und Spermatien beruht demnach auf dem Fehlen einer solchen gegenseitigen Förderung, da beide Geschlechtsorgane das gleiche Genprodukt bilden.

Bei Vorliegen von Semi-Incompatibilität (z. B. in der Kreuzung $+ab\times-a_1b_1$) führt der durch einen verschiedenen Kreuzungstyp bedingte Förderungsmechanismus nur in einer der beiden reziproken Kreuzungen zur Plasmogamie, in der anderen dagegen nicht. Zur Erklärung dieses Phänomens gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Der +/— Förderungsmechanismus fehlt in der incompatiblen Kreuzung.

2. Der +/— Förderungsmechanismus ist in der incompatiblen Kreuzung vorhanden, wird aber durch einen zusätzlichen Mechanismus gehemmt oder unwirksam gemacht.

Wenn jede der beiden nicht-reziproken Incompatibilitäten ($♀a_1b_1\times♂ab$; $♀c_1v_1\times♂cv$) auf dem Fehlen des +/—-Förderungsmechanismus beruhen würde, so müßte man bei der Kreuzung $abc_1v_1\times a_1b_1cv$ eine totale Compatibilität erwarten, denn die $a_1b_1(cv)$-Spermatien müßten die $ab(c_1v_1)$-Ascogone, die $(ab)c_1v_1$-Spermatien die $(a_1b_1)cv$-Ascogone befruchten können. Tatsächlich ist das Gegenteil der Fall. Die SI-Mechanismen addieren sich und lösen eine reziproke Incompatibilität aus.

Wir können daher die erste Erklärungsmöglichkeit ausschließen und *annehmen, daß die SI auf einer Hemmung der +/—-Compatibilität beruht.*

Zur Erklärung dieses Hemmvorganges möchten wir von folgenden experimentellen Befunden ausgehen:

1. Je eine Genkombination ($a_1$ und $b$; $c_1$ und $v$) der beiden für die Incompatibilität verantwortlichen Allelenpaare ist unverträglich. Von $b(v)$ scheinen bestimmte Genwirkungen auf $a_1(c_1)$ auszugehen, die im Heterokaryon von Kern zu Kern über das Cytoplasma erfolgen und die Vermehrungsfähigkeit der $a_1(c_1)$-Kerne negativ beeinflussen.

2. Gleichzeitig mit der Plasmogamie zwischen Trichogyne und Spermatium degenerieren die Trichogynenkerne.

Man kann nun annehmen: In *incompatiblen Kreuzungen* (z. B.: $\varphi + a_1 b_1 \times \sigma - ab$) beginnt nach dem Kontakt von Trichogyne und Spermatium infolge der Diffusion und Reaktion der +/—-Genprodukte die Wandauflösung. Zu gleicher Zeit setzt aber auch die *Genwirkung vom b-Spermatienkern* auf die durch die $a_1$-Kerne determinierte Trichogyne ein. Auf Grund der $a_1$-$b$-Unverträglichkeit wird der *Prozeß der Wandauflösung* gehemmt. Die Plasmogamie bleibt aus. Die „unbefruchtete" Trichogynenspitze wächst unter mehrfacher Verzweigung weiter, wird mit ihren Enden von anderen Spermatien angelockt und legt sich an diese an. Auch in solchen Fällen unterbleibt die Fusion, da sich die gleichen physiologischen Vorgänge wiederholen. In *compatiblen Kreuzungen* (z. B.: $\varphi - ab \times \sigma + a_1 b_1$) kann die von $b$ ausgehende Wirkung die Plasmogamie nicht verhindern. Die $b$-Trichogynenkerne verlieren ihre Wirksamkeit, da gleichzeitig mit dem Beginn der Wandauflösung ihre Degeneration einsetzt. Sie können den durch die Reaktion der +/—-Genprodukte eingeleiteten Vorgang der Wandauflösung nicht mehr abstoppen.

*Die Semi-Incompatibilität basiert also auf einer von den Spermatien ausgehenden Hemmung der Plasmogamie.* Diese Hemmung wird nur wirksam, wenn die Gene $b$ oder $v$ sich im männlichen Gameten befinden. Die $b$-$v$-Genwirkungen können nicht zur Geltung kommen, wenn sich die Faktoren in den Kernen der Trichogyne befinden, d. h. wenn die Mutter $b$ oder $v$ enthält.

Bei einer derartigen Deutung des Phänomens der Semi-Incompatibilität bleibt noch die Frage zu klären, warum in den compatiblen Kreuzungen die in die *ab*- bzw. *cv*-Ascogone eingewanderten $a_1 b_1$, $(c_1 v_1)$-Spermatienkerne nicht durch die Genwirkung der $b$, $(v)$-Kerne eliminiert werden. Man weiß aus dem Verhalten der beiden Kernarten im Heterokaryon, daß die $a_1 b_1$, $(c_1 v_1)$-Kerne nicht sofort, sondern erst im Verlauf des Myzelwachstums zugrunde gehen, da ihre Vermehrungsfähigkeit so stark herabgesetzt wird, daß die *ab*-Kerne einen Selektionsvorteil besitzen. So ist es durchaus möglich, daß sich in den ascogenen Hyphen, die vom befruchteten Ascogon auswachsen, noch eine genügende Anzahl beider Kernarten bilden und paarweise in die jungen Asci einwandern können. Erst nach Keimung der Ascosporen setzen dann die Eliminationsprozesse ein. Bei anderen si-Kreuzungen (z. B.: $S \times C$) scheint jedoch tatsächlich eine derartige Eliminierung von Kernen schon in den Perithezien zu erfolgen, denn in der compatiblen Kreuzung ($\varphi S \times \sigma C$) ist sowohl die Zahl der gebildeten Perithezien als auch die Anzahl der in ihnen enthaltenen Asci im Vergleich zu anderen Kreuzungen herabgesetzt.

Da in der Nachkommenschaft weiterer, genetisch aber nicht analysierter si-Kreuzungen die gleichen Phänomene (vermindert lebensfähige Myzelien, die ihr Wachstum normalisieren, Kernausfall im Heterokaryon) beobachtet wurden, kann man annehmen, daß auch in diesen Fällen die SI letztlich auf der Unverträglichkeit bestimmter Genkombinationen im gleichen Kern oder gleichen Plasma basiert. In diesem Zusammenhang dürfte noch die von Garnjobst (1953, 1955), Garnjobst und Wilson (1956) beobachtete und analysierte protoplasmatische Incompatibilität bei *Neurospora crassa* interessieren. Stämme vom gleichen Kreuzungstyp mit nicht allelen Ernährungsdefekten bilden nur Heterokaryen,

wenn sie für die Allelenpaare *C/c,D/d* homogen sind. Eine Störung der sexuellen Compatibilität wird durch diese Unverträglichkeit heterokaryotischer Kerne allerdings nicht verursacht.

### *2. Die Entstehung spezifischer Mutanten bei Podospora anserina*

Spontan auftretende oder experimentell ausgelöste Mutationen sind meist ungerichtet. Spezifische Mutanten kann man nur durch Selektion erhalten.

Bei *Podospora* konnten wir feststellen, daß Stämme, die infolge bestimmter Kombinationen der SI-Gene vermindert lebensfähig sind, stets in einer bestimmten Richtung mutieren. Wenn $a_1b$- und $c_1v$-Myzelien etwa $10^7$ Kerne enthalten, mutieren sie nach *ab* bzw. *cv*. Mutationen an anderen Genorten konnten nicht beobachtet werden. Diese Erscheinung kann man folgendermaßen erklären: Die Vermehrungsfähigkeit der $a_1b$- und $c_1v$-Kerne ist sehr gering. Sie weisen Deformationen auf und sterben vorzeitig ab. Die betreffenden Myzelien wachsen nur langsam. Auf Grund dieser Anomalien hat jede Mutation, die zu normal lebensfähigen Kernen führt, einen Selektionsvorteil. So kann z. B. die normale Lebensfähigkeit der $a_1b$-Kerne nur durch Mutation an einem oder beiden SI-Loci hergestellt werden. Alle anderen Mutationen (abgesehen von etwa vorhandenen Supressorgenen) heben die Wachstumshemmungen nicht auf.

Eine mutative Veränderung am *b*-Locus würde zur Entstehung eines $a_1b_1$-Kernes führen, der in einem Homokaryon eine normale Vitalität besitzt. Im $a_1b$-Myzel ist dieser Kern jedoch den Genwirkungen von *b* ausgesetzt. Da sein Gen $a_1$ auf diese Wirkungen anspricht, wird die Vermehrungsfähigkeit des $a_1b_1$-Kerns herabgesetzt. Er hat keinen Selektionsvorteil gegenüber den $a_1b$-Kernen. Eine derartige Mutation hat also eine äußerst geringe Chance erkannt zu werden.

Gegen diese Überlegungen spricht die Tatsache, daß im Heterokaryon, das aus einer zweikernigen $a_1b + a_1b_1$-Spore entsteht, die $a_1b$-Kerne eliminiert werden. Dieser Gegensatz besteht jedoch nur scheinbar. Da die $a_1b_1$-Kerne sich schneller teilen als die $a_1b$-Kerne, verschiebt sich im Heterokaryon schon nach kurzer Zeit das in der Spore vorhanden gewesene 1:1-Verhältnis beider Kernarten zugunsten von $a_1b_1$. Die in Überzahl vorhandenen $a_1b_1$-Kerne können von den Wirkungen der *b*-Gene der wenigen $a_1b$-Kerne in ihrer normalen Vitalität nicht gestört werden. Dagegen ist im $a_1b$-Homokaryon ein durch Mutation entstandener $a_1b_1$-Kern den Genwirkungen einer Vielzahl von $a_1b$-Kernen ausgesetzt. Seine Vermehrungsfähigkeit wird gehemmt.

Nach einer Mutation von $a_1$ zu *a* entsteht ein *ab*-Kern, der sowohl im Homokaryon als auch in allen Heterokaryen normal lebensfähig ist. Sein Gen *a* kann von den Wirkungen der *b*-Gene nicht mehr beeinflußt werden. Vielmehr verstärken die durch Teilung des *ab*-Kerns entstandenen Kerne die im $a_1b$-Myzel vorhandenen *b*-Genwirkungen. Sie verdrängen infolge ihres Selektionsvorteils die $a_1b$-Kerne und bestimmen schon nach wenigen Tagen den Genotyp des Myzeliums.

Denselben Selektionsvorteil würde auch ein $ab_1$-Kern haben, der im $a_1b$-Myzel durch gleichzeitige Mutation beider SI-Loci entstehen könnte. Die Wahrscheinlichkeit für eine derartige Doppelmutation in einem Kern ist jedoch äußerst gering.

Mit den gleichen Argumenten kann auch die regelmäßige Mutation der $c_1v$-Stämme nach *cv* erklärt werden.

*Somit kann man annehmen, daß infolge der Genwirkungen von b bzw. v in den vermindert lebensfähigen Myzelien ein „Selektionssieb" vorhanden ist, das nur eine*

*einzige Mutation passieren läßt. Durch diesen genischen Selektionsmechanismus wird eine „gerichtete Mutation" vorgetäuscht.*

Es ist aber auch möglich, daß bei diesen Mutationsvorgängen nicht nur die Selektion eine Rolle spielt. Wir konnten nämlich nur in den Zentren der vermindert lebensfähigen Myzelien eine Mutation beobachten, wenn eine bestimmte Myzelmenge vorhanden war. Die Mutation blieb in Hyphenstücken aus, die vor Erreichen dieses „Alters" umgeimpft wurden. Man könnte demnach vermuten, daß unter dem Einfluß des Gens *b* (bzw. *v*) die Mutation nur dann eintritt, wenn sich die Myzelien in einem bestimmten physiologischen Zustand befinden. Eine derartige Deutung ähnelt den Befunden, die Wheeler (1950) an dem Ascomyceten *Glomerella cingulata* erhielt. Bei diesem Pilz mutiert das Gen *B* nur bei Anwesenheit des Mutatorgens *M* nach *b*, und zwar mit einer Häufigkeit von 30—50%. Auch beim Mais ist eine gen-gesteuerte Auslösung von Mutationen bekannt (Rhoades 1941). Das Gen *a* (Anthocyanbildung) des Chromosoms 3 wird bei Anwesenheit des Gens *Dt* labil und mutiert häufig zu einem seiner Allele.

Dagegen läßt Papazian (1950, 1951) als Erklärung für die Mutation „streak", die in Heterokaryen des Basidiomyceten *Schizophyllum commune* mit gemeinsamem *A*-Faktor an beiden Kernkomponenten vielfach beobachtet wurde, sowohl Selektionsvorgänge als auch eine gen-bedingte Auslösung gelten.

Im Rahmen dieser Betrachtungen ist noch zu erwähnen, daß bei anderen Pilzen und bei Bakterien nach Einwirkung verschiedener chemischer Substanzen spezifische Mutationsspektren beobachtet werden konnten (Kaplan 1952, Demerec 1955, Kölmark 1956, Westergaard 1957).

### *3. Die Bedeutung der Semi-Incompatibilität für die Evolution der Rassen von Podospora anserina*

Bei *Pilzen und Blütenpflanzen*, deren Incompatibilitätserscheinungen durch verschiedene genetische und physiologische Mechanismen bestimmt werden (Übersichten von Whitehouse 1949a, b; 1950; Bateman 1952, 1954, 1955; Lewis 1954, 1956; Burnett 1956; Straub 1958) sind genetisch gleiche Gameten stets incompatibel. Heterogene Kreuzungspartner sind (abgesehen von einigen Sonderfällen) compatibel. Deswegen galt bisher mit Recht die *Incompatibilität als ein Mechanismus zur Inzuchtverhinderung.*

*Die Incompatibilitätserscheinungen in Rassenkreuzungen von Podospora anserina* sind in ihrer genetischen Grundlage, Auslösung und Wirkung dagegen anders geartet. Sie basieren auf der durch die Unverträglichkeit genetisch verschiedener Gameten bestimmten Semi-Incompatibilität und *fördern* somit *die Inzucht und Isolierung der Rassen.*

Diese Isolierung von *Podospora*-Rassen durch die SI erfolgt auf zwei verschiedene Weisen, die beide auf den gleichen Wirkungen der SI-Gene beruhen:

1. In semi-incompatiblen Kreuzungen wird die Zahl der Kreuzungsperithezien auf die Hälfte verringert, da nur eine der beiden reziproken Kreuzungen zur Fruchtkörperbildung führt (= partielle Isolierung). Bei einem Gegeneinanderwirken von 2 SI-Mechanismen wird die Bildung von Kreuzungsperithezien vollständig unterdrückt (= vollständige Isolierung).

2. Wenn in si-Kreuzungen Bastardfruchtkörper zustande kommen, wird das genische Gleichgewicht unter deren Nachkommen entscheidend zugunsten

bestimmter Faktoren der einen Rasse verschoben. Dafür ist die Unverträglichkeit von gewissen Genkombinationen der SI-Gene verantwortlich, die im Homokaryon zur Auslösung spezifischer Mutationen und im Heterokaryon zur Eliminierung von Kernen führt. Für den zweiten Vorgang ist das Vorhandensein von zweikernigen Sporen, die jeweils 2 der 4 Meiosisprodukte enthalten, von ausschlaggebender Bedeutung.

Zum Beispiel: In der Rassenkreuzung $s \times M$ wird die SI durch die additive Wirkung von 2 SI-Mechanismen verursacht. Mit Hilfe der Postreduktionsfrequenzen der SI-Gene kann man berechnen, daß in der $F_1$ dieser Kreuzung 36% aller Kerne eliminiert werden. Unter den restlichen Genotypen beträgt die Genfrequenz der Gene $a_1$ und $c_1$ statt wie erwartet 12,5% nur 6 bzw. 7%.

*Die biologische Bedeutung der Semi-Incompatibilität besteht also in ihrer Fähigkeit, die Rassen von P. anserina zu isolieren.*

Ein ähnliches Isolationssystem existiert auch bei Diplonten. LAVEN (1957a, b) fand bei Kreuzungen zwischen 19 verschiedenen Stämmen von *Culex pipiens*, die an verschiedenen Fundorten in Europa, Afrika und Amerika isoliert wurden, reziproke Compatibilität, nicht-reziproke Incompatibilität (= SI) und reziproke Incompatibilität. Dies ist im Erscheinungsbild eine vollkommene Übereinstimmung mit dem Verhalten der *Podospora*-Rassen. Der Unterschied zwischen beiden Systemen besteht in ihren genetischen Grundlagen: Bei *Culex* wird die Incompatibilität durch plasmatische Faktoren, bei *Podospora* durch Kerngene bestimmt.

Auch bei der monzöischen, homothallischen *Sordaria fimicola* sind einzelne Wildrassen nicht fähig, miteinander zu fruktifizieren (OLIVE 1956). Da dieses Phänomen bisher noch nicht genetisch analysiert wurde, ist noch nicht zu entscheiden, ob die Incompatibilitäts-Erscheinungen chromosomal oder extrachromosomal bedingt sind.

Die Isolierung einzelner Rassen von *Bombardia lunata* (ZICKLER 1934) und von *Neurospora*-Arten (DODGE 1946), die durch das reziproke oder nicht-reziproke Ausbleiben der Fruchtkörperbildung in Rassenkreuzungen (bei verschiedenem Kreuzungstyp) hervorgerufen wird, beruht dagegen nicht auf Incompatibilitäts- sondern auf Sterilitätserscheinungen. Es handelt sich bei den betreffenden Stämmen offenbar um Sexualdefekt-Mutanten, wie sie auch bei *P. anserina* bekannt sind (ESSER 1956b), die nicht mehr hermaphrodit sind und die Fähigkeit verloren haben Ascogone bzw. Spermatien oder Konidien zu bilden.

## Summary

The actions of the genes, which are responsible for the non-reciprocal-incompatibility (semi-incompatibility) between +- and —-strains of *Podospora anserina* have been investigated.

1. In semi-incompatible crosses the fertilization process occurs quite normally in the compatible combination. In the incompatible combination, there is no plasmogamy, in spite of the attraction of the trichogyne by the male sex-organs.

2. Among the progeny of both of the genetically analysed semi-incompatible crosses ($ab \times a_1b_1$; $cv \times c_1v_1$), one of the two recombinant types ($a_1b$ and $c_1v$, respectively) shows a reduced vigor of growth. Upon attaining a certain age,

normally growing *ab* (or *cv*) mycelia arise from $a_1b$ (or $c_1v$) strains by mutation. Mutations in any other direction could not be observed.

3. Heterocaryons from the $F_1$ of both of the semi-incompatible crosses are not balanced and are unstable, when they contain the genes $a_1$ and $b$ (or $c_1$ and $v$). The growth rate of the nuclei, which carry the gene $a_1$ (or $c_1$) is extremly reduced, so that in the course of the growth of the heterocaryon they become eliminated.

4. In crosses between additional geographic races of *P. anserina*, barrage formation always occurs. Barrage formation may be associated with reciprocal compatibility, semi-incompatibility or reciprocal incompatibility. Among the progeny of all inter-racial crosses one always finds recombination-types, which show a reduced vigor of growth and which otherwise behave like the $a_1b$ and $c_1v$ strains in their growth habit. In addition, the elimination of nuclei always occurs in certain heterocaryons.

5. The asymmetry in the fertilization processes in semi-incompatible crosses can be explained on the basis of the observed incompatibility phenomena due to the incompatibility of certain genes which were studied.

6. The regulary occuring mutation of the genes $a_1$ and $c_1$ is discussed.

7. The significance of semi-incompatibility for the isolation of races within the species anserina is presented.

Herr Prof. Dr. Joseph Straub hat diese Untersuchungen stets gefördert. Mit ihm und Herrn Prof. Dr. Georges Rizet (Paris) hatte ich manche anregende Diskussion. Beiden Herren möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Frau O. Poggendorf unterstützte mich bei der Durchführung der Versuche. Ich danke ihr bestens für ihre umsichtige und sorgfältige Hilfe.

## Literatur

Ames, L. M.: An hermaphrodite self-sterile but cross-fertile condition in *Pleurage anserina*. Bull. Torrey. bot. Club **59**, 341—345 (1932). — Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the ascomycete *Pleurage anserina*. Mycologia (N.Y.) **26**, 392—424 (1934). — Bateman, A. J.: Self-incompatibility systems in angiosperms. I. Therory. Heredity **6**, 285—310 (1952). — II. *Iberis amara*. Heredity 8, 305—332 (1954). —III. *Cruciferae*. Heredity **9**, 53—68 (1955). — Burnett, J. H.: The mating-systems of fungi. New Phytologist **55**, 50—90 (1956). — Demerec, M.: What is a gene? — Twenty years later. Amer. Naturalist **89**, 5—10 (1955). — Dodge, B. O.: Spermatia and nuclear migration in *Pleurage anserina*. Mycologia (N.Y.) **28**, 284—291 (1936). — Self-sterility in "bisexual" heterocaryons of *Neurospora*. Bull. Torrey bot. Club **73**, 410—416 (1946). — Esser, K.: Genetische Untersuchungen an *Podospora anserina*. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 143—144 (1955). — Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. 1. Die genetische Analyse der Semi-Incompatibilität. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 595—624 (1956a). — Gen-Mutanten von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm mit männlichem Verhalten. Naturwiss. **43**, 284 (1956b). — Esser, K., u. J. Straub: Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora* Auersw. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 625—626 (1956). — Genetische Untersuchungen an *Sordaria macrospora* Auersw., Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. Z. Vererb.-Lehre **89**, 729—746 (1958). — Franke, G.: Die Cytologie der Ascusentwicklung von *Podospora anserina*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 159—160 (1957). — Garnjobst, L.: Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. **42**, 607—614 (1953). — Further analysis of genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. **42**, 444—448 (1955). — Garnjobst, L., and J. F. Wilson: Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 613—618 (1956). — Kaplan, R. W.: Genetics of microorganisms. Ann. Rew. Microbiol. **6**, 49—76 (1952). — Kölmark, G.: Mutagenic properties

of certains esters of inorganic acids investigated by the *Neurospora* backmutation test. C. R. Lab. Carlsberg **26**, 205—220 (1956). — Laven, H.: Vererbung durch Kerngene und das Problem der außerkaryotischen Vererbung bei *Culex pipiens*. I. Kernvererbung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 443—477 (1957a). — II. Außerkaryotische Vererbung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 478—516 (1957b). — Lewis, D.: Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. Advanc. Genet. **6**, 235—285 (1954). — Incompatibility and plant-breeding. Brockh. Symp. in Biol. **9**, 89—100 (1956). — Mather, K.: Statistische Analysen in der Biologie. (Deutsche Übers.) Wien 1955. — Olive, L. S.: Genetics of *Sordaria fimicola*. I. Ascospora color mutants. Amer. J. Bot. **43**, 97—107 (1956). — Papazian, H. P.: Physiology of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz. **12**, 143—163 (1950). — The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. Genetics **36**, 441—459 (1951). — Rhoades, M. M.: The genetic control of mutability in *Maize*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **9**, 138—144 (1941). — Rizet, G.: Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souches S et s. Rev. Cytol. et Biol. végét. **13**, 51—91 (1952). — Rizet, G., et C. Engelmann: Contribution a l'étude génétique d'un ascomycéte tétrasporé: *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. Rev. Cytol. et Biol. végét. **11**, 202—304 (1949). — Rizet, G., et K. Esser: Sue des phénomènes d'incompatibilité entre souches d'origines differentes chez *Podospora anserina*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **237**, 760—761 (1953). — Rizet, G., et D. Marcou: Longevité et sénescence chez l'ascomycete *Podospora anserina*. Rapp. et Comm. de VIII. Congr. Intern. de Bot. Paris, Sect. IX, p. 121—128, 1954. — Rombaut, J.: Méthode de mise en évidence des noyeaux dans les cellules de *Penicillium chrysogenum* Thom. C. R. Acad. Sci. (Paris) **239**, 1071—1073 (1954). — Straub, J.: Das Überwinden der Selbststerilität. Z. Bot. **46**, 98—110 (1958). — Westergaard, M.: Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. Experientia (Basel) **13**, 224—234 (1957). — Wheeler, H. E.: Genetics of *Glomerella*. VIII. A genetic basis for the occurence of minus mutants. Amer. J. Bot. **37**, 304—312 (1950). — Whitehouse, H. L. K.: Multiple-allelomorph heterothallism in the fungi. New Phytologist **48**, 212—242 (1949a). — Heterothallism and sex in fungi. Biol. Rev. **24**, 411—447 (1949b). — Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms. Ann. Bot. **14**, 199—216 (1950). — Zickler, H.: Genetische Untersuchungen an einem heterothallischen Askomyzeten (*Bombardia lunata* nov. spec.). Planta (Berl.) **22**, 573—613 (1934). — Zur Entwicklungsgeschichte des Askomyzeten *Bombardia lunata* Zckl. Arch. Protistenk. **98**, 1—70 (1952).

Privatdozent Dr. Karl Esser, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Zeitschrift für Vererbungslehre, 90, 53—61 (1959)

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie

# ZUR WIRKUNGSWEISE DES WHITE-ALLELS BEI DROSOPHILA MELANOGASTER

Von

IRMGARD ZIEGLER-GÜNDER und LOTHAR JAENICKE

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 5. November 1958)*

Die Augen von *Drosophila melanogaster* sind durch Pterin- und Ommochrompigmente gefärbt. Als Folge einer Mutation beobachtet man sowohl Fehlen der Ommochrome (z. B. bei *cinnabar*, *vermilion* oder *scarlet*) als auch der Pterine (z. B. bei *brown*). Außerdem kann das Muster der verschiedenen Pterine qualitativ oder quantitativ verändert werden (z. B. bei *sepia*; vgl. HADORN und MITCHELL 1951, ZIEGLER-GÜNDER und HADORN 1958). Schließlich kennen wir eine Mutante (*white*), deren Augen weder Ommochrome noch Pterine besitzen und die sich bei Transplantation in einen +-Wirt autonom verhalten. Die Wirkungsweise dieses im x-Chromosom gelegenen Allels ist noch weitgehend unbekannt, und es wurden bisher nur seine Auswirkungen auf den Phänotyp in den einzelnen Entwicklungsstufen beschrieben.

Im Insektenauge sind die Pigmente in Zellpartikel eingelagert, die als Proteingranula beschrieben wurden. KÜHN und SCHWARTZ (1942) vermuteten, daß sowohl bei der weißäugigen Mutante von *Ephestia kühniella* (*wa*) als auch bei der *w*-Mutante von *Drosophila* der Ausfall sämtlicher Pigmente dadurch zustande kommt, daß das Trägereiweiß qualitativ oder quantitativ verändert und dadurch die Bindung des Pigmentes bzw. seiner Vorläufer verhindert sein könnte. Tatsächlich konnte HANSER (1948) zeigen, daß bei der weißäugigen Mutante von *Ephestia* die Primärwirkung in einem Ausfall der Trägergranula zu suchen ist.

Es erhob sich nun die Frage, ob bei der *w*-Mutante von *Drosophila melanogaster* der Ausfall aller Pigmente durch einen biochemischen Unterschied zwischen Wildform und Mutante oder ebenfalls mit dem Fehlen der Trägergranula zu erklären ist.

In der vorliegenden Mitteilung wird gezeigt, daß die Augen von Wildform und Mutante die gleichen Granula enthalten, diese sich aber in ihren enzymatischen Fähigkeiten unterscheiden, was am Beispiel der Succinodehydrase und Tyrosinase untersucht wurde.

## Ergebnisse

### *A. Die Trägergranula*

*a) Histologische Befunde.* Beim Wildstamm werden durch die Schnittbehandlung und vor allem durch die der Hämatoxylin-Färbung vorangehende Beize die Pigmente gelöst. Es bleiben tiefblaue, stark lichtbrechende, etwa 0,3 $\mu$ große Granula zurück. Sie entsprechen ganz den von HANSER (1948) bei *Ephestia* beschriebenen „Trägergranula". Im Gegensatz zur *wa*-Mutante bei *Ephestia*

finden sich jedoch in den primären und sekundären Pigmentzellen der *white*-Mutante von *Drosophila* die gleichen Trägergranula. Sie lassen weder in Anzahl, noch in Form, Größe oder Lage irgendwelche Unterschiede zum Wildtyp erkennen (Abb. 1). Vergleicht man in Quetschpräparaten die Granula des Wildtyps, aus denen das Pigment mit verdünntem Ammoniak gelöst worden war, mit den farblosen *white*-Granula phasenkontrast-optisch, lassen sich ebenfalls keine Unterschiede feststellen. Bei der Färbung mit Janusgrün B, die für die Mitochondrien mit der in ihnen enthaltenen Cytochromoxydase charakteristisch ist (vgl. Lang und Siebert 1954), zeigen die Pigmentgranula — besonders bei *white*, wo die Störung durch das rote Pigment wegfällt — die typische grüne Farbe.

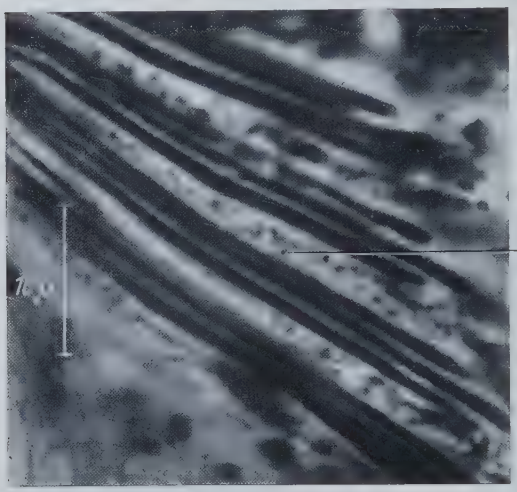



Abb. 1. Schnitt durch das Auge einer *white*-Mutante von *Drosophila melanogaster*. Färbung: Weigertsches Hämatoxylin. Die Trägergranula der „Pigmentzellen" sind wie beim Wildstamm vorhanden

*b) Biochemische Analyse.* Die Pigmentgranula bzw. Trägergranula wurden analog der Mitochondrien-Aufarbeitung in Anlehnung an die Methode von Hogeboom, Schneider und Pallade (1948) durch fraktioniertes Zentrifugieren isoliert. Man erhält einheitliche Granula-Präparate, die in Abb. 2 gezeigt sind. Ihre Zusammensetzung gab pro Kopf folgende Werte (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Augengranula von Drosophila melanogaster*

| | Wildtyp | *white*-Mutante |
|---|---|---|
| Trichloressigsäure-fällbares Protein | 1,4 $\gamma$ | 1,85 $\gamma$ |
| Ribonucleinsäure durch Ribosebestimmung | 0,17 $\gamma$ | 0,23 $\gamma$ |
| Ribonucleinsäure durch Phosphatbestimmung | 0,22 $\gamma$ | 0,22 $\gamma$ |
| Lipoidphosphat | $2{,}2 \times 10^{-3}\gamma$ | $2{,}4 \times 10^{-3}\gamma$ |
| Verhältnis Protein/Ribonucleinsäure | 8:1 | 8:1 |

Ein ähnliches Protein/Ribonucleinsäure-Verhältnis wurde auch für die Mitochondrien gefunden, wie z. B. für die Mitochondrien der Mäuseleber: pro Gramm Frischgewicht 34 mg Protein, 1,48—1,81 mg Ribonucleinsäure (vgl. Lang und Siebert 1954).

### *B. Enzyme der Trägergranula*

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß die Unfähigkeit der *white*-Augen, die ankommenden Pterin- und Ommochromvorstufen weiter zu verarbeiten, nicht in dem Fehlen des Trägers oder in seiner Zusammensetzung zu suchen ist, erhob sich die Frage, ob bei den Trägergranula von *white* Enzyme fehlen, die direkt oder indirekt bei der Synthese der beiden Pigmente beteiligt sein könnten.

Wir untersuchten die Enzyme der biologischen Oxydation in 86 Std alten Puppen besonders aus folgenden Gründen:

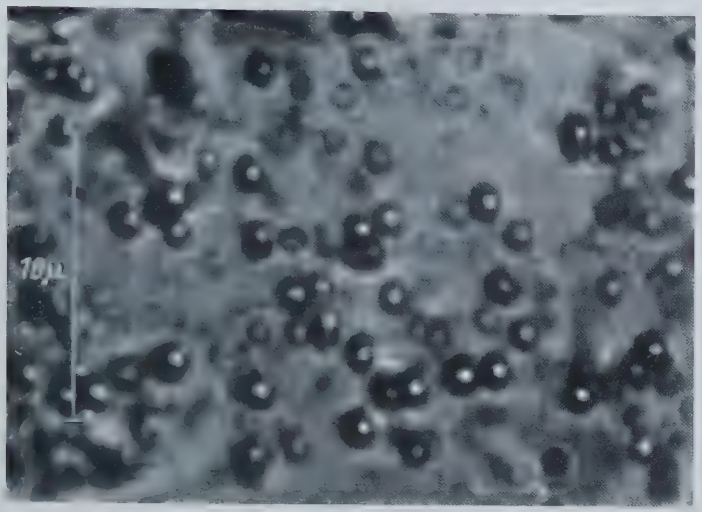



Abb. 2. Durch fraktioniertes Zentrifugieren isolierte Pigmentgranula des Wildstammes von *Drosophila melanogaster*

1. Die Augenpterine liegen in reduzierter Form vor: Das gelbe Pterin, das bei Belichtung weitgehend in Pterincarbonsäure (6) übergeht (Forrest und Mitchell 1955; Ziegler-Günder 1956), weist bereits reduzierende Eigenschaften auf, läßt sich jedoch mit Na-borhydrid noch weiter hydrieren (Jaenicke und Ziegler unveröffentlicht) und gibt dabei — neben einer kleinen Menge Xanthopterin — das bereits früher beschriebene (Ziegler-Günder 1956) stark photolabile Pterin. Ist das gelbe Pterin eine Dihydro-, dürfte das photolabile die Tetrahydroverbindung darstellen. Letztere wird am Licht sehr rasch oxydiert und ergibt dann ebenfalls Pterincarbonsäure (6).

2. Die Synthese der Augenpterine erfolgt zu dem gleichen Zeitpunkt (Hadorn und Ziegler-Günder 1958), an dem auch die Atmungskurve wieder steil ansteigt (vgl. Wigglesworth 1955).

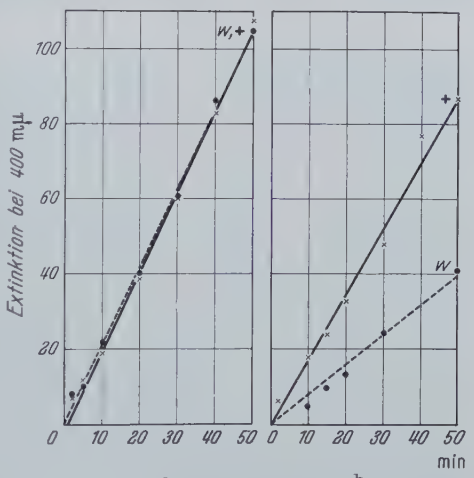



Abb. 3a u. b. Aktivität der Succinodehydrase isolierter Augengranula von + und *white* (je 60 Köpfe). a Testlösung mit Phosphatpuffer pH 7,4/Rohrzucker 0,35 M; b Testlösung mit Phosphatpuffer pH 7,4

3. Die Trägergranula ähneln in ihrer Zusammensetzung und ihrem Protein/Ribonucleinsäureverhältnis den Mitochondrien, in denen bekanntlich die Enzyme der biologischen Oxydation enthalten sind.

Da Pterin- und Flavinbiosynthese miteinander verknüpft zu sein scheinen, verglichen wir auch die Aktivität der Xanthinoxydase in Wildform und Mutante.

Die Ergebnisse dieser Versuche, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind, zeigen signifikante Unterschiede nur bei der Succinodehydrase und Tyrosinase, die wir nun näher studierten.

*a) Die Succinodehydrase.* Isolierte Augengranula zeigen eine relativ hohe Succinodehydrase-Aktivität. Sie macht nahezu $^1/_3$ der gesamten Succinodehydrase der Puppe aus.

Sehr auffallend ist das Verhalten des Enzyms in Lösungen verschiedenen osmotischen Druckes. In *isotonischer* Lösung zeigen die isolierten Granula von + und *w* keinen Unterschied (Abb. 3a). Während jedoch die Augengranula des Wildstammes auch in *hypotonischer* Lösung ihre Aktivität behalten, beträgt sie bei der *white*-Mutante nur die Hälfte des +-Wertes (Abb. 3b), hängt also weitgehend von dem Quellungszustand der Granula ab.

Tabelle 2. *Relative Aktivitäten verschiedener Enzyme der biologischen Oxydation sowie von Flavinenzymen in den Augengranula von Wildform und white-Mutante*

| | Wild-form | *white*-Mu-tante |
|---|---|---|
| Cytochromoxydase | 1,0 | 0,8 |
| Isocitronensäure-dehydrase | 1,0 | 1,1 |
| Äpfelsäure-dehydrase | 1,0 | 0,6 |
| Fumarase | 1,0 | 0,6 |
| α-Ketoglutarsäure-dehydrogenase | 1,0 | 0,9 |
| Aconitase | 1,0 | 1,0 |
| Xanthinoxydase | 1,0 | 1,0 |
| Succinodehydrase | 1,0 | 0,4 |
| Tyrosinase | 1,0 | 3,0 |

*b) Tyrosinase und „Protyrosinase".* Homogenate von *white*-Puppen schwärzen sich beim Stehen rascher und intensiver als +-Homogenate.

Nach den bisherigen Kenntnissen (Horowitz und Fling 1955, Jaenicke in Vorbereitung) ist die Tyrosinase in Protoplasmapartikeln enthalten und wird dort aus einem „Proenzym" durch einen nicht dialysierbaren Faktor aktiviert. Ein Teil der „Protyrosinase" ist bereits unmittelbar nach dem Homogenisieren aktiv; die vollständige Umwandlung in die Tyrosinase ist nach 40 min langem Stehen des Homogenates bei Zimmertemperatur erreicht. Das aktivierende Prinzip, der „Aktivator", befindet sich nach hochtourigem Zentrifugieren eines Homogenates im Überstand und kann durch Adsorption der Protyrosinase und Tyrosinase an Calcium-Phosphat-Gel von diesen befreit werden. Die Umwandlung der „Protyrosinase" in Tyrosinase wird durch Komplexon vollständig gehemmt, während Tyrosinase komplexon-unempfindlich ist. So ist es möglich, Tyrosinase und „Protyrosinase" quantitativ zu messen: Der Ansatz mit Komplexon gibt die im Augenblick des Komplexon-Zusatzes schon aktive Tyrosinase, der ohne Komplexon die „Gesamttyrosinase".

Werden Granula und Lymphe nicht getrennt, finden sich beim Arbeiten in *isotonischer* Lösung und nach vollständiger Aktivierung der Protyrosinase beim Wildstamm und bei der *white*-Mutante gleiche Tyrosinase-Aktivitäten (Abb. 4a und 5a, *I*). Arbeitet man jedoch in *hypotonischer* Lösung, so weist der Wildstamm nur etwa $^1/_3$ der Aktivität der *white*-Mutante auf (Abb. 4b und 5b, *I*).

Trennt man Granula und Lymphe sofort nach dem Homogenisieren in *isotonischer* bzw. *hypotonischer* Lösung durch hochtouriges Zentrifugieren, nimmt in *isotonischer* bzw. *hypotonischer* Lösung wieder auf und führt erst dann (Abb. 5a, *II*;

5b, *II*) oder nach nochmaligem Waschen (Abb. 5a, *III*; 5b, *III*) die Aktivierung und die Tyrosinase-Bestimmung aus, so erhält man für + und *w* identische, aber niedrige Tyrosinase-Werte, die der Tyrosinase-Aktivität des komplexon-gehemmten Ansatzes entsprechen (Tabelle 3).

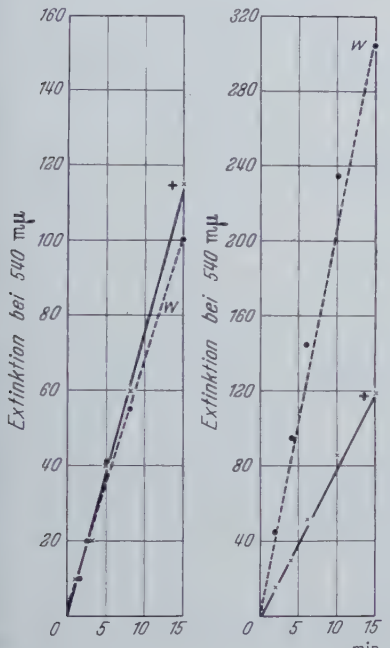



Abb. 4

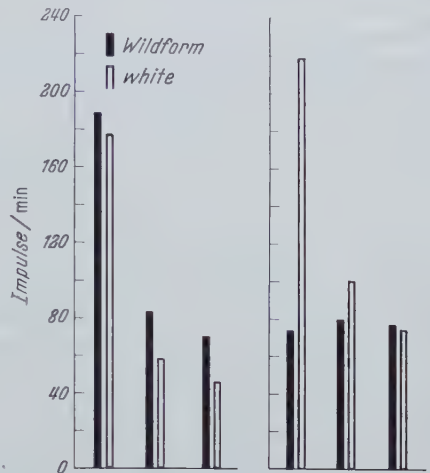



Abb. 5

Abb. 4a u. b. Tyrosinaseaktivität der Augengranula von + und *white*. Granula und Lymphe nicht getrennt. a In Periston (je 70 Köpfe in 0,15 ml); b in Phosphatpuffer pH 6,8/Rohrzucker 0,003 M (je 100 Köpfe in 0,12 ml)

Abb. 5a u. b. Tyrosinaseaktivität der Augengranula von + und *white* (je 150 Köpfe in 0,3 ml aufgearbeitet). a Phosphatpuffer pH 6,8/Rohrzucker 0,35 M/$CaCl_2$ 0,001 M, pro Ansatz 0,1 ml (50 Köpfe); b Phosphatpuffer pH 6,8/Rohrzucker 0,003 M/$CaCl_2$ 0,001 M, pro Ansatz 0,1 ml (50 Köpfe); *I* Granula und Lymphe nicht getrennt; *II* nach hochtourigem Abzentrifugieren der Granula in a oder b aufgenommen; *III* einmal in a oder b gewaschen

Tabelle 3. *Tyrosinase-Aktivität der Augengranula von white (je 50 Köpfe in 0,1 ml). Granula und Lymphe nicht getrennt*

| Aufarbeitung und Präinkubation | Tyrosinase-Aktivität (Menge des gebildeten Melanins aus $C^{14}$-Tyrosin) |
|---|---|
| Phosphatpuffer $p_H$ 6,8 Rohrzucker 0,35 M . . . . . | 201 I./min |
| Phosphatpuffer $p_H$ 6,8/Rohrzucker 0,35 M/Komplexon 0,005 M | 70 I./min |

Von der Lymphe getrennte Augengranula zeigen nur „Anfangstyrosinase". Da die Werte hierfür bei + und *w* sowohl in *iso-* als auch in *hypotonischer* Lösung gleich hoch sind, ist zu schließen, daß die „Anfangstyrosinase" als bereits „aktivierte" Tyrosinase in allen Fällen gleich fest an die Granula gebunden ist. Umgekehrt lassen die geringen Werte des Gesamthomogenates von +-Fliegen in *hypotonischer* Lösung darauf schließen, daß die +-„Protyrosinase" weniger fest an die Granula gebunden ist. Sie wird in *hypotonischer* Lösung beim Stehen von ihnen entweder leichter abgelöst und inaktiviert oder kann überhaupt nur in situ aktiviert werden.

Das aktivierende Agens befindet sich in der Lymphe, denn die Aktivierung der bei *white* fest, beim Wildstamm locker an die Augengranula gebundenen „Protyrosinase" kann nicht nur durch die Lymphe des ursprünglichen Homogenates, sondern nach Abtrennung der Granula auch durch Zusatz des angereicherten, von Tyrosinase befreiten „Protyrosinase" und „Aktivators" aus ganzen Puppen erreicht werden (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Tyrosinase-Aktivität der Augengranula von white (je 50 Köpfe in 0,1 ml); Aufarbeitung in Phosphatpuffer pH 6,8/ Rohrzucker 0,35 M. Granula sofort nach dem Homogenisieren von der Lymphe getrennt*

| Probe | Tyrosinase-Aktivität (Menge des gebildeten Melanins aus $C^{14}$-Tyrosin) | |
|---|---|---|
| | Versuch 1 | Versuch 2 |
| Granula + 0,1 ml Überstand . . . | 219 | 183 I./min |
| Granula + 0,1 ml Aktivator[1] . . . | 195 | 168 I./min |
| Granula + 0,1 ml Puffer/Rohrzucker 0,35 M . . . . . | 116 | 99 I./min |
| 0,1 ml Überstand ohne Granula . . | 53 | 54 I./min |

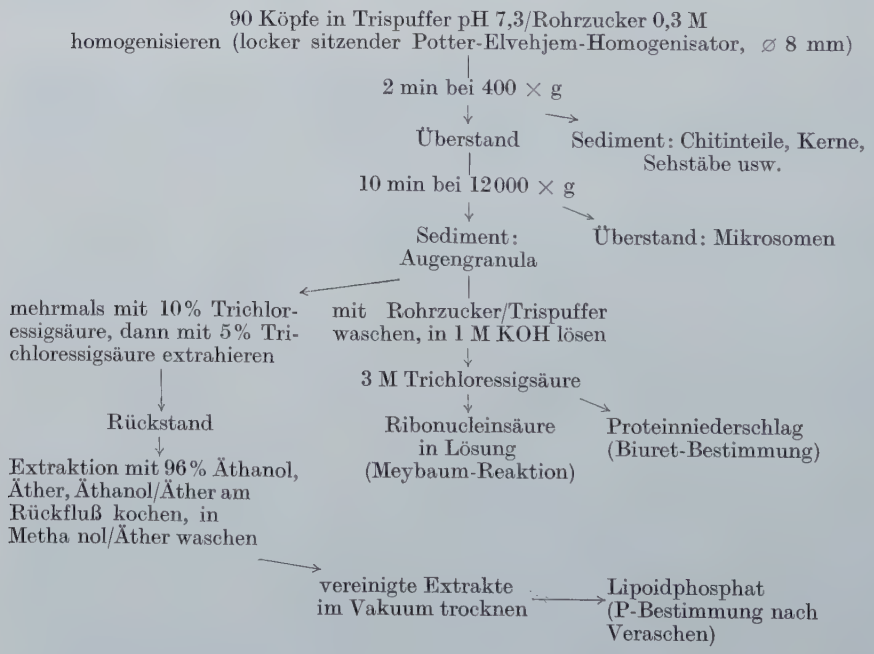
[1] Die Menge des Aktivators entspricht derjenigen von 6 Puppen.

## Material und Methodik

Die beiden Stämme wurden bei 25° C auf Standardfutter (135 g Mais, 65 g Zucker, 6,5 g Agar, Hefe/Liter Wasser) gezüchtet.

Für die histologische Untersuchung wurden die Köpfe adulter Fliegen in Carnoy oder absolutem Äthanol fixiert, über Azeton und Dekalin in Paraffin eingebettet und die 10 $\mu$ dicken Schnitte mit Weigertschem Hämatoxylin nach vorheriger Beize mit Eisen-Alaun gefärbt.

Die Isolierung und Aufarbeitung der Granula geschah in Anlehnung an die Mitochondrien-Isolierung nach Hogeboom, Schneider und Palade (1948) auf folgende Weise:




Die Einheitlichkeit der Augengranula-Präparate wurde stets mikroskopisch kontrolliert (Abb. 2).

Für die enzymatischen Bestimmungen wurden die Puppenköpfe im Alter von 86 Std (±1 Std) nach der Verpuppung präpariert.

*a)* Folgende Enzyme wurden in den isolierten Granula (Isolierung siehe *b*) mit Hilfe des optischen Testes (Colowick, Kaplan 1955, Bd. 1) bestimmt: Aconitase (s. S. 695), Isocitronensäure-dehydrase (s. S. 699), Fumarase (s. S. 729), Äpfelsäure-dehydrase (s. S. 735) und a-Ketoglutarsäure-dehydrogenase (s. S. 714). Die Cytochromoxydase wurde nach Straus (1954) bestimmt. Die Xanthinoxydase wurde an der Fähigkeit, 2-Amino-4-oxypterin zu Isoxanthopterin zu oxydieren, gemessen (Glassmann, Forrest, Mitchell 1956).

*b) Succinodehydrase.* Je 60 Köpfe werden in eisgekühltem, m/10 Phosphatpuffer pH 7,4/ Rohrzucker 0,35 M $CaCl_2$ 0,001 M homogenisiert, zuerst bei 500 × g, der Überstand dann bei 12000 · g 10 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Granula werden 1mal mit der Puffer/Rohrzuckerlösung gewaschen und in 0,2 ml wieder aufgenommen.

Ausführung der Aktivitätsbestimmung: 0,2 ml Succinat (0,2 M)
0,2 ml KCN (0,1 M)
0,2 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,01 M)
0,2 ml Granula-Suspension
Totalvolumen auf 1,8 ml mit Puffer bzw. Puffer/Rohrzuckerlösung

Die Abnahme der Absorption bei 400 m$\mu$ wird gegen eine Kontrolle ohne Succinatzusatz gemessen (Colowick, Kaplan 1955, S. 725).

*c) Tyrosinase.* Nach Präparation werden die Köpfe sofort in flüssige Luft gebracht, je 150 Stück dann in *isotonischer* (0,3 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8/0,35 M Rohrzucker/ 0,001 M $CaCl_2$ oder in Periston — als Blutplasmaersatz erhältliche Kollidonlösung der Fa. Bayer) oder *hypotonischer* Lösung (0,3 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8/Rohrzucker 0,003 M/ $CaCl_2$ 0,001 M) homogenisiert und bei 500 × g zentrifugiert. Zur Aktivierung der Protyrosinase wurden das Homogenat bzw. die durch 10 min langes Zentrifugieren bei 12000 g von der Lymphe abgetrennten Granula bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Aktivität der Tyrosinase wurde auf folgende Weisen bestimmt:

1. 0,1 ml der Testlösung werden mit 0,05 ml einer radioaktiven Tyrosinlösung (0,01 M Tyrosin mit 0,025 $\mu$C) versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 10% Trichloressigsäure abgestoppt, das ausgefällte Melanin abzentrifugiert und nach dreimaligem Waschen mit 5% Trichloressigsäure seine Radioaktivität bestimmt.

2. 0,1 ml der Testlösung werden mit 0,1 ml Dioxyphenylalanin (0,01 M) versetzt und mit *isotonischer* bzw. *hypotonischer* Puffer/Rohrzuckerlösung oder mit Periston auf 2 ml aufgefüllt. Der Anstieg der Extinktion bei 450 m$\mu$ wird gemessen.

Zur Hemmung der Aktivierung der Protyrosinase wurde in einer Puffer/Rohrzuckerlösung homogenisiert, die Komplexon in einer Konzentration von 0,005 M enthielt.

## Diskussion

Für die Frage, über welche stoffwechselphysiologischen Wege eine Genmutation mit dem durch sie hervorgerufenen veränderten Phänotyp verknüpft ist, besitzen wir in den zahlreichen Augenfarbmutanten von *Ephestia* und *Drosophila* geeignetes Untersuchungsmaterial.

Während die Ursache der „Polyphänie" der Genwirkung von *wa* und *w* (vgl. Hadorn und Egelhaaf 1956) bei der weißäugigen *Ephestia*-Mutante darin gefunden wurde, daß die Trägergranula und damit die beiden Pigmente — Pterine und Ommochrome — fehlen (Hanser 1948), sind bei der *white*-Mutante von *Drosophila* Granula zwar vorhanden, aber ihre Eigenschaften müssen so abgewandelt sein, daß die Endsynthese oder die Verankerung der herangeführten Pigmentvorstufen unmöglich wird. Grundsätzlich ist die *white*-Mutante fähig, Pterine zu bilden. Ihre Synthese hat jedoch einen charakteristischen zeitlichen Verlauf: sie

treten während der Puppenruhe im Auge in geringer Konzentration auf, nehmen im letzten Drittel wieder ab und sind bei der geschlüpften Imago vollkommen verschwunden (Hadorn und Ziegler 1958). Dafür scheidet *white* beim Schlüpfen mit den Meconien eine große Menge fluoreszierender Verbindungen aus (Hadorn und Kürsteiner 1955), großenteils einfache Pterine. Da sich das Auge der Mutante bei Transplantation in einen +-Wirt autonom verhält (Beadle und Ephrussi 1936), fehlt ihm offenbar die Fähigkeit, die vom Körper herangeführten Pterinvorstufen zu den komplizierter gebauten — wahrscheinlich in hydrierter Form vorliegenden — Augenpterinen aufzubauen. Das nur wenig abgewandelte Pteringrundgerüst wird wieder ausgeschieden.

Die Trägergranula der Pigmente, in denen auch mit der Pyronin/Ribonuclease-Methodik von Caspari und Richards (1948) Ribonucleinsäure nachgewiesen worden war, ähneln, wie wir gesehen haben, sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrer enzymatischen Ausstattung mit Enzymen des Tricarbonsäurezyklus Mitochondrien. Die gefundenen Unterschiede in der Aktivität der Succinodehydrase und des Tyrosinase-Komplexes zwischen Wildform und *white*-Mutante lassen sich als weitere phänotypische Auswirkung des *white*-Allels deuten. Jedoch kann auch ein ursächlicher Zusammenhang mit der Pigmentbildung bestehen: Es ist wahrscheinlich, daß die Rolle der Trägergranula bei der Endsynthese der Augenpigmente eng mit einer energieverbrauchenden Reaktion verknüpft ist. Auch die Tatsache, daß es sich bei den Augenpterinen — wenigstens teilweise — um hydrierte Verbindungen handelt und ihr Erscheinen zeitlich an den Wiederanstieg der Atmungskurve im letzten Drittel der Puppenruhe geknüpft ist, steht damit im Einklang. Für die Ommochromsynthese stellte Danneel (1941) bereits fest, daß die letzten Schritte ihrer Synthese an den Augengranula atmungsabhängig ist.

In den Mitochondrien (vgl. Lang 1952) ist die Succinodehydrase sehr fest an die Matrix gebunden; dies trifft auch für die Augengranula der Wildform von *Drosophila* zu. Die durch den Mutationsschritt hervorgerufene Änderung der enzymtragenden Eiweißstruktur — statt der Succinodehydrase ist nun die Protyrosinase fest verankert — könnte die zur Bindung und Synthese der beiden Pigmente nötigen energieliefernden Reaktionen so verändern, daß der dynamische Stoffwechselzustand der Wildform eine neue Gleichgewichtslage suchen muß, bei der es nicht mehr zur Bildung der Pigmente kommt. Andererseits könnte auf physikalischem Wege durch Veränderung der Mikrostruktur, die sich auch in der verschiedenen Bindung der beiden Enzyme an die Matrix des Granulums äußern wird, die Pigmentbildung verändert werden, indem spezifische Orte der Bindung oder Synthese verdeckt sind oder fehlen. Eine elektronenoptische Prüfung der Trägergranula könnte hier weiter führen.

## Zusammenfassung

In den pigmentfreien Augen der *white*-Mutante von *Drosophila melanogaster* wurden die gleichen Trägergranula histologisch nachgewiesen, in die die Augenpigmente (Pterine und Ommochrome) bei der Wildform eingelagert sind. In Zusammensetzung (Protein, Ribonucleinsäure, Lipoidphosphat) und biochemischer Funktion (hohe Aktivität der Enzyme der biologischen Oxydation) ähneln

sie Mitochondrien. Die Granula der Mutante unterscheiden sich von denen der Wildform darin, daß in ihnen die Succinodehydrase locker, die Protyrosinase dagegen fester gebunden ist, wie Enzymteste in Medien verschiedenen osmotischen Druckes ergaben. Diese Unterschiede in den Enzymaktivitäten können eine weitere phänotypische Auswirkung des *white*-Allels sein; auf einen ursächlichen Zusammenhang dieser Ergebnisse mit der fehlenden Fähigkeit, die Endstufen der Augenpigmente zu synthetisieren, wird hingewiesen.

Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Wir danken Herrn Dipl.-Chem. E. Brode für wertvolle Mitarbeit.

## Literatur

Beadle, G. W., and B. Ephrussi: The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. Genetics **21**, 225—247 (1936). — Caspari, E., and J. Richards: Genic Action. Ann. Rep. Carnegie Inst. Wash. Year Book **47**, 183—189 (1948). — Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology, vol. 1. New York: Academic Press 1955. — Danneel, R.: Die Ausfärbung überlebender *v* und *cn-Drosophila*-Augen mit Produkten des Tryptophanstoffwechsels. Biol. Zbl. **61**, 388—399 (1941). — Forrest, H. S., E. Glassmann and H. K. Mitchell: Conversion of 2-Amino-4-Hydroxypteridine to Isoxanthopterin in *D. melanogaster*. Science **124**, 725—728 (1956). — Hadorn, E., u. A. Egelhaaf: Biochemische Polyphänie und Stoffverteilung im Körper verschiedener Augenfarb-Genotypen von *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11** b, 21—25 (1956). — Hadorn, E., u. R. Kürsteiner: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **30**, 8—12 (1955). — Hadorn, E., and H. K. Mitchell: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paperchromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 650—665. — Hadorn, E., u. I. Ziegler-Günder: Untersuchungen zur Entwicklung, Geschlechtsspezifität und phänogenetischen Autonomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 221—234 (1958). — Hanser, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranula bei verschiedenen Rassen von *Ephestia kühniella* Z. und *Ptychopoda seriata* Schrk. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 74—97 (1948). — Hogeboom, G. H., W. C. Schneider and G. Palade: Cytochemical studies of mammalian tissues. J. biol. Chem. **172**, 619—635 (1948). — Horowitz, N. H., and M. Fling: The autocatalytic production of tyrosinase in extracts of *Drosophila melanogaster*. In: A symposium on amino acid metabolism. Edit.: W. E. McElroy u. B. Glass. Baltimore: John Hopkins Press 1955. — Kühn, A., u. V. Schwartz: Über eine weißäugige Mutante (*wa*) von *Ephestia kühniella*. Biol. Zbl. **62**, 226—230 (1942). — Lang, K.: Lokalisation der Fermente und Stoffwechselprozesse in den einzelnen Zellbestandteilen und deren Trennung. In: Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. 3. Coll. der Ges. f. Physiol. Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — Lang, K., u. G. Siebert: Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente. In: B. Flaschenträger u. E. Lehnartz, Physiologische Chemie, Bd. II, Teil 1 b. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — Straus, W.: Colorimetric microdetermination of cytochrome c oxidase. J. biol. Chem. **207**, 733—743 (1954). — Wigglesworth, V. B.: Physiologie der Insekten (Übers. M. Lüscher). Basel u. Stuttgart: Birkhäuser 1955. — Ziegler-Günder, I.: Untersuchungen über die photolabilen Pterine in der Haut der Amphibien und in den Augen von *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **11** b, 493—500 (1956). — Ziegler-Günder, I., u. E. Hadorn: Manifestation rezessiver Augenfarb-Gene im Pterin-Inventar heterozygoter Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 235—245 (1958).

Dr. Irmgard Ziegler-Günder, Botanisches Institut der TH Darmstadt, Roßdörferstraße 140

Zeitschrift für Vererbungslehre, 90, 62—65 (1959)

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Groß-Lüsewitz der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. R. Schick)

# DAS PACHYTÄN-GENOM VON SOLANUM VERNEI

Von

H. Fiedler und J. Schreiter

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 6. November 1958)*

Einige Formen des *Solanum vernei* besitzen wegen ihrer Resistenz gegen aggressive Typen des Kartoffelnematoden *(Heterodera rostochinensis)*, gegen verschiedene Biotypen des Krebserregers, gegen das Y-Virus sowie wegen ihrer Feldresistenz gegenüber *Phytophthora infestans*, ihrer Frostresistenz und wegen ihren relativ großen, gut geformten Knollen züchterisches Interesse (Brücher 1951, v. Wangenheim, Frandsen und Ross 1957, Rothacker 1958). Da bereits heute eine große Anzahl von Bastarden zwischen *S. vernei* und anderen kultivierten und wilden Kartoffelarten vorhanden sind, erschien es zweckmäßig, als Vorarbeit für eine Genomanalyse innerhalb der Gattung *Solanum* die genomatischen Verhältnisse des *S. vernei* (Abb. 1) zu klären, wie dies schon durch zytogenetische Untersuchungen in den Meiosen von Bastarden (Swaminathan und Howard 1953, v. Wangenheim 1954 u. a.) und durch Pachytänanalysen (Gottschalk 1954, Gottschalk und Peters 1954, 1955 und 1956) versucht wurde.

Abb. 1. *S. vernei*, in 15 cm-Töpfen kultiviert

Bei verschiedenen *Solanum*-Arten konnten infolge unzweckmäßiger Fixierungsmethoden und Präparationstechnik bisher nur solche Pachytänchromosomen identifiziert werden, die außerhalb der Verknäuelung lagen. Wenn auf diese Weise der gesamte Chromosomensatz erfaßt war, wurde das Pachytän-Genom in Form eines Karyogrammes schematisch dargestellt. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß es möglich ist, zur Pachytänanalyse geeignete, übersichtliche Kerne zu erhalten. Es ist wahrscheinlich, daß sich die Genome verschiedener Arten mit dieser Methode sicher vergleichen lassen und Fehldeutungen der chromosomenmorphologischen Unterschiede durch Benutzung des vollständigen Chromosomensatzes vermieden werden können.

## Material und Methode

Für die zytologische Untersuchung wurden von Brücher zur Verfügung gestellte Klone der *Solanum vernei*-Herkunft KSG — L 41/6 aus dem Aconquija-Gebirge (Nord-Argentinien) verwendet[1]. Die Pflanzen kultivierten wir im Gewächshaus in 15 cm-Töpfen. Durch mehrere Mischdüngergaben konnte während der ganzen Vegetationsperiode eine große Anzahl von Knospen gebildet werden[2]. Der reiche Knospenansatz erlaubte bei der Fixierung die unbedingt notwendige Auswahl nach der Antherengröße. Die Größe der Antheren und der Zeitpunkt des Fixierens boten keine Anhaltspunkte, Pachytänkerne mit dem gewünschten Grad der Chromosomenkontraktion zu erhalten. Als Fixierungsgemisch wurde Carnoy (Alkohol: Eisessig, 3:1) verwendet. Aus arbeitstechnischen Gründen konnte das frisch fixierte Material nicht immer sofort verarbeitet werden, so daß bei überalterten Fixierungen Verklebungen der Chromosomen und Deformationen des gesamten Pachytänkernes auftraten, worauf auch v. Wangenheim (1957) hinweist. Allerdings konnten diese „Fixierungsfehler" auch vereinzelt bei frisch fixiertem Material beobachtet werden. Unsachgemäßes Quetschen der PMZ beeinflußt ebenfalls die Qualität der Pachytänkerne. Schon ein seitlicher Druck auf das Deckglas genügt, eine unnatürliche Dehnung oder Torsion der sehr empfindlichen Chromosomen herbeizuführen.

Günstige Resultate erzielten wir durch Färben der Chromosomen nach der Karminessigsäuremethode. Die freigelegten Antheren wurden jedoch vorher in 4%igem Ferriammoniumsulfat 1 Std gebeizt. Vor und nach dem Beizen erfolgte eine 1stündige Wässerung Brown (1940). Die Färbezeit konnte bis auf 20 Tage ausgedehnt werden, ohne daß sich beim Quetschen der Präparate in

Abb. 2. Pachytän, *S. vernei*, Vergr. 3000mal

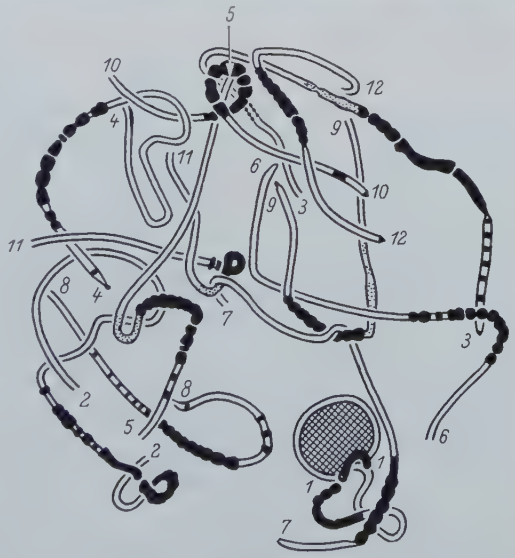



Abb. 3. Zeichnung von Abb. 2

[1] Herrn Prof. Brücher, Mendoza, sei auf diesem Wege für die Überlassung des wertvollen Wildkartoffelmaterials gedankt.

[2] Unser Dank gebührt auch Herrn Dr. Rothacker, der durch die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und durch wertvolle Hinweise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat-

45%iger Essigsäure eine Überfärbung der Chromosomen bemerkbar machte. Alle ausgewerteten Pachytänkerne wurden deshalb 15—20 Tage gefärbt.

## Ergebnis der Untersuchungen

Obwohl im frühen Pachytänstadium die Reihenfolge und Größe der Chromomeren, besonders auf den euchromatischen Abschnitten übersichtlicher angeordnet ist, gelang es in diesem Stadium bei der Länge der Chromosomen nicht, eine Analyse sämtlicher Chromosomen vorzunehmen. Bei fortgeschrittener Kontraktion wurde es aber möglich, den gesamten Chromosomensatz eines Kernes zu erfassen und zu identifizieren. Allerdings war es notwendig, eine sehr große Anzahl fixierter Knospen (etwa 10000 Präparate) zu testen. Aus dem verarbeiteten Material erhielten wir 14 vollständig auswertbare Pachytänkerne[1]. Präparate mit Chromosomen, die außerhalb des Knäuels lagen, wurden nicht ausgewertet, da die Identifizierung wegen der strukturellen Ähnlichkeit mehrerer Chromosomen innerhalb des Genoms nur mit geringer Sicherheit möglich ist. Die in der Mikrophotographie (Abb. 2) und der dazugehörigen Zeichnung (Abb. 3) infolge der Lage ihrer heterochromatischen Region schlecht erkennbaren Chromosomen Nr. 1 und Nr. 11 sind einwandfrei in anderen übersichtlichen Kernen erfaßt und eingeordnet worden. Die Klassifizierung der Chromosomen wurde in Anlehnung an Gottschalk (1954) vorgenommen nach der Länge des ganzen Chromosoms und dessen Symmetrieverhältnissen und nach der Länge der heterochromatischen Region (Abb. 4). Die Lage der Insertionsstelle ließ sich in unseren Pachytänkernen, wie aus dem Karyogramm ersichtlich ist, nicht genau bestimmen. Im Gegensatz zu v. Wangenheim (1957) ermittelten wir bei den ausgewerteten Kernen nur geringe Differenzen in der Länge der identischen Chromosomen. Die Chromosomen Nr. 8, 9, 10, 11 und 12 (Abb. 4) ließen sich auf Grund ihres geringen Längenunterschiedes nur schwer unterscheiden. Bei näherer Untersuchung des Ausmaßes und der Lage ihrer heterochromatischen Abschnitte ließen sie sich auch sicher identifizieren. Da der Grad der Chromosomenkontraktion schon innerhalb einer Theka variiert, ist es erforderlich, daß alle Chromosomen in einem Kern erfaßt werden.

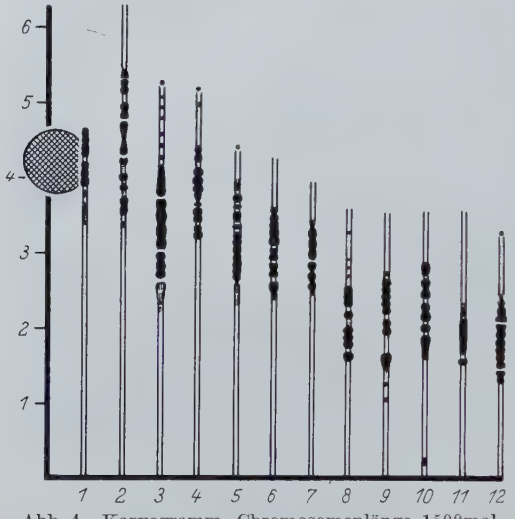


Abb. 4. Karyogramm, Chromosomenlänge 1500mal

Eine exakte Auszählung der Makro-Chromomeren ist nur bei Chromosomen in einem bestimmten Kontraktionsgrad möglich. Dann sind aber die Pachytänkerne unübersichtlich und eine Auswertung fast aussichtslos. Eine Auszählung

[1] Die ausgewerteten Kerne sind teilweise im Dauerpräparat und als Mikrophotographie vorhanden.

der Makro-Chromomeren wäre in unserem Falle auch zwecklos gewesen, da die strukturelle Beschaffenheit der heterochromatischen Abschnitte infolge ihrer Kontraktion eine klare Lage des Zentromers nicht mehr erkennen ließen.

Vergleichen wir die Morphologie unserer *S. vernei*-Chromosomen (Abb. 4) mit der des Karyogramms von Gottschalk und Peters (1954), so läßt sich nur bei dem Chromosom Nr. 1, dem Nucleolus-Chromosom, eine geringe Ähnlichkeit feststellen, während die Längenverhältnisse und Strukturen der anderen Chromosomen einen Vergleich nicht zulassen.

Durch weitere Pachytänanalysen soll versucht werden, zytogenetische Beziehungen zwischen den Wildkartoffelarten und Bastarden zu finden.

## Zusammenfassung

1. Bei *Solanum vernei* wurde eine Pachytänanalyse durchgeführt.

2. Die Identifizierung der Chromosomen erfolgte nur an vollständigen und übersichtlichen Pachytänkernen.

3. Eine Übereinstimmung des identifizierten Pachytän-Genoms von *S. vernei* mit dem früherer Autoren konnte nicht erzielt werden.

## Literatur

Brown, S. W.: The structure and meiotic behaviour of the differentiated chromosomes of tomato. Genetics **34**, 437–461 (1949). — Brücher, H.: Probleme der Abstammung der Kulturkartoffel. Naturwiss. Rdsch. **8**, 345—350 (1951). — Gottschalk, W.: Die Chromosomenstruktur der Solanaceen unter Berücksichtigung phylogenetischer Fragestellungen. Chromosoma (Berl.) **6**, 539—626 (1954). — Gottschalk, W., u. N. Peters: Die Chromosomenstruktur als Kriterium für Abstammungsfragen bei Tomate und Kartoffel. Z. Pflanzenzüchtg **34**, 71—84 (1954). — Die Chromosomenstruktur diploider Wildkartoffelarten und ihr Vergleich mit der Kulturkartoffel. Ein Beitrag zum Abstammungsproblem der Kartoffel. Z. Pflanzenzüchtg **34**, 351—374 (1955). — Das Konjugationsverhalten partiell homologer Chromosomen. Chromosoma (Berl.) **7**, 708—725 (1956). — Peters, N.: Zytologische Untersuchungen an *Solanum tuberosum* und polyploiden Wildkartoffelarten. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 373—398 (1954). — Rothacker, D.: Beiträge zur Resistenzzüchtung gegen den Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Wollenweber). III. Untersuchungen über den Einfluß unterschiedlicher Kreuzungspartner auf die Ausbildung verschiedener Knolleneigenschaften bei Kartoffelkreuzungen, zugleich ein Beitrag zur Züchtungsmethodik. Züchter **28**, 133–143 (1958). — Swaminathan, M. S., and H. W. Howard: The cytology and genetics of the potato (*Solanum tuberosum*) and related species. Bibliogr. genet. (Den Haag) **16**, 1—192 (1953). — Wangenheim, K.-H., Frhr. v.: Zur Ursache der Kreuzungsschwierigkeiten zwischen *Solanum tuberosum* L. und *S. acaule* Bitt. bzw. *S. stoloniferum* Schlechtd et Bouché. Z. Pflanzenzüchtg **34**, 7—48 (1954). — Das Pachytän und der weitere Ablauf der Meiose in diploiden *Solanum*-Arten und -Bastarden. Chromosoma (Berl.) **8**, 671—690 (1957). — Wangenheim, K.-H. Frhr. v., N. O. Frandsen u. H. Ross: Über neue Ergebnisse zur Zytologie und verwandte Fragen bei *Solanum*. Z. Pflanzenzüchtg **37**, 41—76 (1957).

H. Fiedler, Institut für Pflanzenzüchtung der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Groß-Lüsewitz Post Rostock 2

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 66—73 (1959)

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

# GENETIC ANALYSIS OF α-METHYL-GLUCOSIDE FERMENTATION IN SACCHAROMYCES

By

Toshiaki Takahashi and Yonosuke Ikeda

With 2 Figures in the Text

*(Eingegangen am 20. Oktober 1958)*

It was reported by Lindegren (1949), Hestrin and Lindegren (1951, 1952), and Lindegren and Lindegren (1956) that the hybrid between a α-methyl-glucoside fermenter and a non-fermenter of *Saccharomyces* gave rise to two fermenters and two non-fermenters upon ascospore formation. Thus it was thought that the fermentation is under the control of one pair of alleles (*MG/mg*). Meanwhile, Takahashi, Saito and Ikeda (1958) have experienced, in the tetrad analysis of the hybrid produced between a homothallic α-methyl-glucoside non-fermenter and a heterothallic fermenter, irregular segregation with regard to the fermentation of this sugar.

This paper is concerned with detailed studies of the genetic background of α-methyl-glucoside fermentation. Evidence supporting the view that the fermentation is controlled by three complementary genes is to be described. Each of the three genes is concerned with slow fermentation, and coexistence of two or three genes improves the fermentation significantly.

## Material and Methods

Strain 675—13 was derived from the hybrid between a homothallic strain and a heterothallic strain through the procedures shown in Fig. 1.

675—13: mating type α; adenine and arginine requirement; galactose, sucrose and maltose fermenter; α-methyl-glucoside non-fermenter.

L—8256: mating type *a*; adenine requirement and arginine non-requirement; galactose, sucrose and maltose non-fermenter; α-methyl-glucoside fermenter (this strain was supplied through the courtesy of Dr. C. C. Lindegren).

A modified Lindegren's yeast broth (Saito and Takahashi 1957) was used as complete medium. For the sugar fermentation tests, glucose was replaced in the complete medium by 2% of an appropriate sugar and an alcoholic solution of brom-cresolpurple was added. Fermentation was examined in one ml of the above medium, and the strains showing color change after one day at 25° C were registered as fermentation positive; those that failed to change color under the same condition were recorded as negative. The fermentation of α-methyl-glucoside was tested by a special method. Because various types of slow fermenters were found among the segregants, the degree of fermentation was measured by the use of modified Durham tubes as well as B.C.P. indicator tubes. The modification was performed as follows: by placing a test tube, having a volume of 160 × 16 mm, upsidedown in a larger test tube (210 × 30 mm) containing 40 ml medium in-

oculated with one loopful of fresh cells, the accumulation of carbon-dioxide in the smaller test tube and the reduction of the $p_H$ value after incubation at 25° C could be recorded for more than thirty days. Sporulation was conducted on FOWELL's medium (FOWELL 1952).

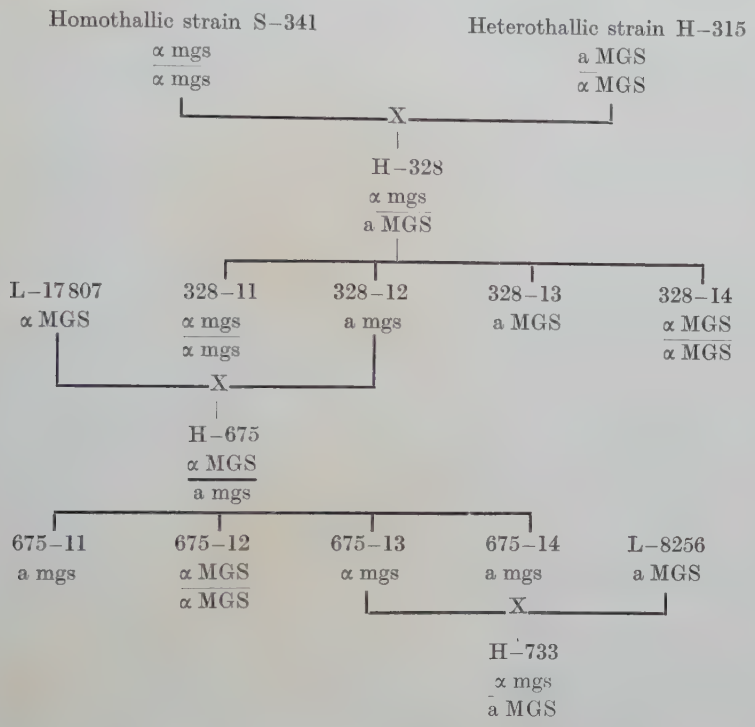



Fig. 1. Pedigree showing the origin of strain 675–13

Nutritional requirements were determined by the presence or absence of positive growth on minimal medium supplemented with adenine (20 mg/1000 ml) and/or L-arginine (100 mg/1000 ml).

Genotypes are to be expressed in the following way: mating type (*α/a*); independence/dependence of arginine (*AR/ar*); ability/inability to ferment galactose (*GA/ga*), sucrose (*SU/su*) and maltose (*MA/ma*). Complementary genes concerning α-methyl-glucoside fermentation will be described later. The degree of fermentation and the symbols corresponding to non-fermenter, extremely-slow-fermenter, slow-fermenter, medium-fermenter, semi-rapid-fermenter and rapid-fermenter are shown in Table 1.

## Results

As reported previously, some tetrads of the hybrid between a homothallic strain S-341 and a heterothallic strain H-315 did show a 1:3 segregation of *MGS:mgs* (see Table 1 in TAKAHASHI, SAITO and IKEDA 1958). In this work, however, one offspring, 675-13, derived from the hybrid and a Carbondale strain, L-8256, were employed as starting materials, because the former strain is a

Table 1. *Phenotypic symbols and phenotypes*

| Symbol | Phenotype (days for a positive reaction) | | | | | Remarks |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | BCP method | Durham tube | | modified Durham tube | | |
| | color change | color change | $CO_2$ accumulation | color change | $CO_2$ accumulation | |
| MGS–rr | 1 | 1 | 2 | 1—4 | 2—6 | rapid-fermenter |
| MGS–r | 2 | 1 | 3 | 1—6 | 3—10 | semi-rapid-fermenter |
| MGS–m | 3—4 | 3—4 | 7—9 | 2—8 | 10—22 | medium-fermenter |
| MGS–l | 5—7 | 6—9 | 13—16 | 8—12 | 13—26 | slow-fermenter |
| MGS–ll | 14—17 | 17—22 | ? | 16—24 | 22—30 | extremely-slow-fermenter |
| mgs | — | — | — | — | — | non-fermenter |

heterothallic haploid culture having only the $HM_1$ gene just as the Carbondale strain L-17807 (TAKAHASHI 1958).

Crosses between these two strains (*α ar GA SU MA mgs × a AR ga su ma MGS*) were carried out by the method of LEUPOLD and HOTTINGUER (1954). As seen in Table 2, some tetrads of the resulting hybrid showed irregular segregation with regard to α-methyl-glucoside fermentation. In general, the number of fermenter type segregants per ascus exceeded that of the non-fermenter type, however, the degree of fermentation of that sugar by the positive fermenters was not equal. In other words, they were either rapid-fermenters, medium-fermenters, slow-fermenters or extremely-slow-fermenters. The phenotypes corresponding to these fermentation degrees were expressed as *MGS-rr*, *MGS-m*, *MGS-l*, and *MGS-ll* in accordance with the criteria given in Table 1.

Table 2. *Segregation data of the hybrid H-733*
675–13 α ar GA SU MA mgs
L–8256 a AR ga su ma MGS–rr

| Segregant | Segregation | Hypothetical genotype with regard to α-methyl-glucoside fermentation |
|---|---|---|
| 733–51 | α ar GA su MA MGS–rr | $MG_1\ MG_2\ MG_3$ |
| 52 | a AR ga SU ma mgs | $mg_1\ mg_2\ mg_3$ |
| 53 | a ar ga SU MA mgs | $mg_1\ mg_2\ mg_3$ |
| 54 | α AR GA su ma MGS–rr | $MG_1\ MG_2\ MG_3$ |
| 733–61 | a ar GA SU ma mgs | $MG_1\ mg_2\ mg_3$ |
| 62 | α AR ga su MA MGS–l | $mg_1\ MG_2\ mg_3$ |
| 63 | a AR GA su MA MGS–ll | $mg_1\ mg_2\ MG_3$ |
| 64 | α ar ga SU ma MGS–rr | $MG_1\ MG_2\ MG_3$ |
| 733–71 | a ar GA SU ma MGS–ll | $mg_1\ mg_2\ MG_3$ |
| 72 | α ar ga SU MA MGS–m | $MG_1\ MG_2\ mg_3$ |
| 73 | a AR GA su ma MGS–ll | $mg_1\ mg_2\ MG_3$ |
| 74 | α AR ga su MA MGS–m | $MG_1\ MG_2\ mg_3$ |
| 733–91 | α ar GA SU MA MGS–rr | $MG_1\ MG_2\ MG_3$ |
| 92 | a AR ga SU MA MGS–l | $mg_1\ MG_2\ mg_3$ |
| 93 | a ar ga su ma mgs | $MG_1\ mg_2\ mg_3$ |
| 94 | α AR GA su ma MGS–ll | $mg_1\ mg_2\ MG_3$ |

Next, each segregant obtained from these ascus analyses was either intercrossed, outcrossed, or backcrossed as shown in Table 3, and the fermentability of the resulting diploid strains was expressed in *MGS* symbols. To explain the results of these hybridization tests, three alleles ($MG_1/mg_1$, $MG_2/mg_2$ and $MG_3/mg_3$) were assumed for the reasons below.

The diploid cultures produced from two non-fermenters (675-13 × 733-52, 675-13 × 733-53, 675-13 × 733-61 and 675-13 × 733-93) were still non-fermenters.

Among them, strain 733-52 and 733-53 may not involve any dominant genes, because crosses of these strains with strains listed in the left column of Table 3 did not influence at all the phenotypic expression of the latter strains. Concequently, the genotype of strains 733-52 and 733-53 can be presumed to be $mg_1$ $mg_2$ $mg_3$. While the fact that the diploid cultures from a slow-fermenter (733-62) and non-fermenter (733-61 and 733-93) were medium-fermenter suggests that two complementary genes might be working together for medium-fermentation. Thus it is supposed that strain 733-61 and 733-93 have the genotypes $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ and strain 733-62 has $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$. The diploid culture from a cross between a non-fermenter (675-13) and a slow-fermenter (733-92) was a slow-fermenter as was the case with the hybrids between 733-62 and 733-52 and between 733-53 and 733-62; therefore the genotype of 675-13 may be $mg_1$ $mg_2$ $mg_3$. Strain 733-92 behaved like strain 733-62, so that the genotype should be $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$.

Extremely-slow-fermenters (733-63, 733-71 and 733-73) enhanced the fermentability of the resulting diploids from slow-fermenter to semi-rapid fermenter, from medium-fermenter to rapid-fermenter, and from non-fermenter to extremely-slow-fermenter when crossed with a slow-fermenter (733-62), medium-fermenters (733-72 and 733-74) and a non-fermenter (675-13) respectively. In contrast to this, as stated before, strains having the $MG_1$ gene (733-61 and 733-93) did not enhance fermetability when crossed with non-fermenter (675-13) or with an extremely-slow-fermenter (733-94). Therefore it is clear that the gene being carried in strains 733-63, 733-71 and 733-73 is different from $MG_1$. This gene is termed as $MG_3$, and the genotype of the extremely-slow-fermenter can be expressed as $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$.

Table 3. *Phenotypes of hybrids obtained by intercrosses, outcrosses and backcrosses*

| Parent | a | 733-52 | 733-53 | 733-61 | 733-63 | 733-71 | 733-73 | 733-92 | 733-93 | L-8256 | Hypothetical genotype |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| α | Phenotype | mgs | mgs | mgs | MGS-ll | MGS-ll | MGS-ll | MGS-l | mgs | MGS-rr | |
| 733–51 | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS rr | MGS rr | MGS–rr | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ |
| 733–54 | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ |
| 733–62 | MGS–l | MGS–l | MGS–m | MGS–r | MGS–r | MGS–r | MGS–r | MGS–l | MGS–m | MGS–rr | $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ |
| 733–64 | MGS rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ |
| 733–72 | MGS–m | MGS–m | MGS–m | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–m | MGS–m | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ |
| 733–74 | MGS–m | MGS–m | MGS–m | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–m | MGS–m | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ |
| 733–91 | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | MGS–rr | $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ |
| 733–94 | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–r | MGS ll | MGS–rr | $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ |
| 675–13 | mgs | mgs | mgs | mgs | MGS–ll | MGS–ll | MGS–ll | MGS–l | mgs | MGS–rr | $mg_1$ $mg_2$ $mg_3$ |
| Hypothetical genotype | | $mg_1$ $mg_2$ $mg_3$ | $mg_1$ $mg_2$ $mg_3$ | $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | |

Table 4. *Segregation data of the hybrid H-831*
733–64 α ar ga SU ma $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$
733–61 a ar GA SU ma $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$

| Segregant | Segregation | Phenotype for α-methyl-glucoside |
|---|---|---|
| 831–11 | a GA $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 12 | α ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 13 | a ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 14 | α GA $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS–ll |
| 831–21 | α ga $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 22 | α ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 23 | a GA $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS–ll |
| 24 | a GA $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 831–41 | a GA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 42 | α ga $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 43 | α ga $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 44 | (non-germinating) | |
| 831–61 | α GA $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 62 | a GA $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS–ll |
| 63 | α ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 64 | (non-germinating) | |
| 831–71 | a GA $MG_1$ $mg_2$ $mg_3$ | mgs |
| 72 | a ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 73 | α GA $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS–ll |
| 74 | α ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |

Table 5. *Segregation data of the hybrid H-833*
733–64 α ar ga SU ma $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$
733–63 a AR GA su MA $mg_1$ $mg_2$ $Mg_3$

| Segregant | Segregation | Phenot for α-met glucosi |
|---|---|---|
| 833–11 | a ar ga su MA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 12 | a AR GA su ma $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 13 | α AR GA SU ma $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 14 | (non-germinating) | |
| 833–21 | a AR GA SU MA $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 22 | α ar ga SU MA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 23 | a ar GA su ma $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 24 | (non-germinating) | |
| 833–31 | α ar ga su MA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 32 | a AR GA SU ma $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 33 | α ar ga SU MA $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 34 | (non-germinating) | |
| 833–41 | α AR ga su ma $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 42 | a AR ga SU MA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 43 | α ar GA su MA $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 44 | a ar GA SU ma $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 833–51 | a AR GA su ma $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 52 | a AR ga su MA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 53 | a ar ga SU MA $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS– |
| 54 | α ar GA SU ma $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$ | MGS– |

Table 6. *Segregation data of the hybrid H-835*
733–91 α ar GA SU MA $Mg_1$ $MG_2$ $MG_3$
733–92 a AR ga SU MA $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$

| Segregant | Segregation | Phenotype for α-methyl-glucoside |
|---|---|---|
| 835–11 | α ar ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 12 | a AR ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 13 | α ar GA $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–r |
| 14 | (non-germinating) | |
| 835–21 | α AR ga $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 22 | a AR GA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 23 | a ar GA $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 24 | α ar ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 835–31 | a AR ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 32 | a ar ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 33 | α ar GA $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 34 | (non-germinating) | |
| 835–41 | α ar ga $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–r |
| 42 | α ar ga $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 43 | a AR GA $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 44 | a AR GA $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 835–51 | a AR GA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 52 | α ar GA $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–rr |
| 53 | a AR ga $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 54 | α ar ga $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 835–61 | a AR ga $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–m |
| 62 | α AR ga $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ | MGS–r |
| 63 | a ar GA $mg_1$ $MG_2$ $mg_3$ | MGS–l |
| 64 | (non-germinating) | |

The genotype of strains 733-72 and 733-74, both medium-fermenter, was determined as $MG_1$ $MG_2$ $mg_3$, because these strains produced rapid-fermenters when crossed with strains having genotype $mg_1$ $mg_2$ $MG_3$. Finally, the rapid-fermenting strains, L-8256, 733-51, 733-54, 733-64 and 733-91 are $MG_1$ $MG_2$ $MG_3$. The conclusions so far drawn are listed in the right column and the lowest row of Table 3.

In order to test the validity of the above mentioned hypothesis in pedigree cultures, three hybrids, H-831 (733-64 × 733-61), H-833 (733-64 × 733-63) and H-835 (733-91 × 733-92), were analysed with the results shown in Table 4, 5 and 6. As seen in the tables, no descrepacy was found between hypothesis and the gene-constitutions. $MG_1$ $mg_2$ $MG_3$ and $mg_1$ $MG_2$ $MG_3$ were newly isolated among the segregants, and they fermented α-methyl-glucoside in the same degree

as the hybrids between $MG_1\ mg_2\ mg_3$ and $mg_1\ mg_2\ MG_3$ and between $mg_1\ MG_2\ mg_3$ and $mg_1\ mg_2\ MG_3$ respectively.

Fig. 2 shows the results of a comparative study carried out with strains having different genotypes. Two or three haploid cultures were employed for each genotype, and the average values for parallel cultures of each strain are illustrated. Strains of genotypes $MG_1\ mg_2\ mg_3$ or $mg_1\ mg_2\ mg_3$ do not ferment α-methyl-glucoside at all, and strains with $MG_1\ mg_2\ MG_3$ and $mg_1\ mg_2\ MG_3$ genotypes do so extremely slowly. Meanwhile, strains with $mg_1\ MG_2\ mg_3$ constitution are slow-fermenters. This fact indicates that $MG_2$ is the most effective among the three dominant genes. Strains carrying the combination of $MG_1$ and $MG_2$, or $MG_2$ and $MG_3$ ferment α-methyl-glucoside faster than any strains having one of these genes. Strains having the three dominant genes, $MG_1\ MG_2\ MG_3$, are the best fermenters.

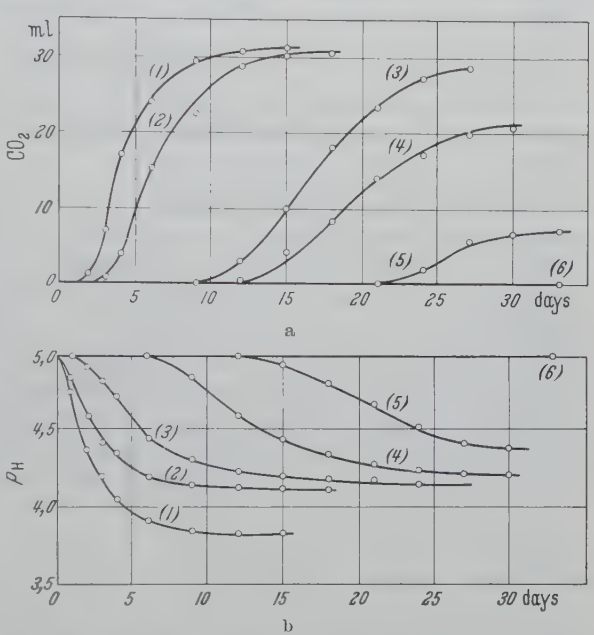



Fig. 2 a and b. a Carbon-dioxide accumulation and b $p_H$-reduction (1) $MG_1\ MG_2\ MG_3$ (MGS rr); (2) $mg_1\ MG_2\ MG_3$ (MGS–r); (3) $MG_1\ MG_2\ mg_3$ (MGS–m); (4) $mg_1\ MG_2\ mg_3$ (MGS–l); (5) $MG_1\ mg_2\ MG_3$ (MGS–ll); $mg_1\ mg_2\ MG_3$ (MGS–ll); (6) $MG_1\ mg_2\ mg_3$ (mgs) $mg_1\ mg_2\ mg_3$ (mgs)

## Discussion

When Takahashi, Saito and Ikeda (1958) discovered an irregular segregation with regard to α-methyl-glucoside fermentation, positive or negative fermentation was judged after three days. In the present work, however, the cultures were left under observation for more than thirty days, and it is for this reason that other types of fermenters such as extremely-slow-fermenter, slow-fermenter, medium-fermenter, and semi-rapid-fermenter were found in the course of study.

In this paper, the authors intend to interpret the presence of these various classes under the assumption that three genes, $MG_1$, $MG_2$ and $MG_3$, are working together for the fermentation of α-methyl-glucoside, and from the results of hybridization tests and fermentation tests they are convinced that the hypothesis was verified. Then, how is each of these genes concerned with the fermentation?

As shown by the comparative study described in Fig. 2 the haploid culture carrying gene $MG_2$ alone fermented the sugar after a delay of 14 days, while the strain with gene $MG_3$ alone did so after about 22 days and the strain with $MG_1$ alone did not ferment at all. Therefore, they are related to the fermentation in a quantitative way, and the gene $MG_2$ is most influential among the three. In combined forms, the combination $MG_1$ and $MG_3$ showed no increase in sugar fermentation over $MG_3$ alone, while the combination of $MG_1$ and $MG_2$, or $MG_2$

and $MG_3$, was very effective as seen in the figure, suggesting that both $MG_1$ and $MG_3$ are able to activate the function of the $MG_2$ gene. As it is believed that α-methyl-glucoside is fermented by the co-operation of α-methyl-glucosidase and the zymases of yeast, and since it is evident that the zymase system of the present strains is healthy as can be deduced from the full fermentation of glucose, the most responsible gene for the production of α-methyl-glucosidase may be $MG_2$ and the second $MG_3$. The $MG_3$ gene, which is concerned with extremely-slow-fermentation, accelerated the function of $MG_2$ very extensively. Therefore, it should be considered that the transportation of α-methyl-glucoside from medium to cell was blocked by genetic demage at the $MG_3$ locus as thought by DOUGLAS and CONDIE (1954) in the case of galactose fermentation. Nevertheless, because gene $MG_3$ did not affect the function of $MG_1$ as it did $MG_2$, a final conclusion must be drawn after tests with lysates.

The identity or nonidentity of these gene with genes responsible for the formation of maltase or sucrase, can be deduced from segregation data. As seen in two haploid cultures in Table 5, strain 833-41 is a maltose negative fermenter and 833-43 is a positive fermenter although both strains are equipped with the same genotype, $mg_1\ mg_2\ MG_3$. Moreover, there are a maltose fermenter (733-53) and a maltose non-fermenter (733-52) which have the same genotype $mg_1\ mg_2\ mg_3$. Accordingly, it is presumed that the $MG_3$ gene has nothing to do with maltose fermentation. In the same way, the $MG_3$ gene seems not related to sucrose fermentation as shown by strains 833-12 and 833-13 in Table 5. As well, it seems that the $MG_1$ and $MG_2$ genes by themselves are different from genes for sucrose fermentation as evidenced by the differences between 733-61 and 733-93 and between 733-62 and 733-92 in Table 2. Moreover, strains 733-51, 733-91, 733-54 and 733-64 were α-methyl-glucoside rapid fermenters, nevertheless 733-51 and 733-91 were maltose fermenters and the remainder were non-fermenters. Therefore, the authors wish to conclude that *MG* genes have no connection with maltose and sucrose fermentation, although there still remain the posibility that one of the *MG* genes might possibly work together with other gene(s) for the fermentation of these sugars. In connection with this, it must be commented here that no linkage relationship was found between the *MG* genes and the *SU* gene and between the *MG* genes and the *MA* gene.

As strains L-8256 and 675-13 were non-fermenters of melezitose and turanose, none of the *MG* genes seems to have any connection with the *MZ* gene (LINDEGREN and LINDEGREN 1953), but the relation must be studied further in the future.

## Summary

The hybrid produced between a Carbondale haploid strain (α-methyl-glucoside rapid fermenter) and a haploid strain (non-fermenter), derived from a hybrid between a homothallic and a heterothallic *Saccharomyces*, showed an irregular segregation pattern with regard to the fermentation of this sugar.

To explain this irregularity, three pairs of alleles, $MG_1/mg_1$, $MG_2/mg_2$ and $MG_3/mg_3$, were assumed to be in quantitative control of the fermentation. Haploid cultures carrying the genotypes (1) $mg_1\ mg_2\ mg_3$, (2) $MG_1\ mg_2\ mg_3$, (3) $mg_1\ MG_2\ mg_3$, (4) $mg_1\ mg_2\ MG_3$, (5) $MG_1\ MG_2\ mg_3$, (6) $MG_1\ mg_2\ MG_3$, (7) $mg_1\ MG_2\ MG_3$, and

(8) $MG_1\,MG_2\,MG_3$, were actually recovered. Strains equipped with: either (1) or (2); either (4) or (6); (3); (5); (7); or (8) are non-fermenters, extremely-slow-fermenters, slow-fermenters, medium-fermenters, semi-rapid-fermenters and rapid-fermenters respectively.

The role of these genes in sugar fermentation and the identity or nonidentity of some of these genes with maltose and sucrose genes was discussed.

***Acknowledgment.*** The authors wish to express their thanks to Dr. Fancis J. Ryan for his valuable comments and criticism of the manuscript.

## Literature cited

Douglas, H. C., and F. Condie: The genetic control of galactose utilization in *Saccharomyces*. J. Bact. **68**, 662—670 (1954). — Fowell, R. R.: Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeasts. Nature (Lond.) **170**, 578 (1952). — Hestrin, S., and C. C. Lindegren: Gene function in the homologous and heterologous induction of α-glucosidases in yeast by α-glucosides. Nature (Lond.) **168**, 913 (1951). — Carbohydrases in *Saccharomyces* haploid stocks of defined genotype. II. Gene-controlled induction of glucosidases by α-glucosides. Arch. Biochem. **38**, 317—334 (1952). — Leupold, U., and H. Hottinguer: Some data on segregation in *Saccharomyces*. Heredity **7**, 243—258 (1954). — Lindegren, C. C.: The yeast cell, its genetics and cytology, 1st edn. St. Louis: Educ. Publ. 1949. — Lindegren, C. C., and G. Lindegren: The genetics of melezitose fermentation in *Saccharomyces*. Genetica **26**, 430—444 (1953). — Eight genes controlling the presence or absence of carbohydrate fermentation in *Saccharomyces*. J. gen. Microbiol. **15**, 19—28 (1956). — Saito, H., and T. Takahashi: Gene controlled adenine dependence epistatic to color production in *Saccharomyces*. Jap. J. Genetics **32**, 147—152 (1957). — Takahashi, T.: Complementary genes controlling homothallism in *Saccharomyces*. Genetics **43**, 705—714 (1958). — Takahashi, T., H. Saito and Y. Ikeda: Heterothallic behavoir of a homothallic strain in *Saccharomyces* yeast. Genetics **43**, 249—260 (1958).

Dr. Toshiaki Takahashi, Brewing Scientific Research Institute, Asahi Breweries Co. Ltd., Suita-shi (Japan)

Professor Yonosuke Ikeda, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 74—82 (1959)

From the Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts

# A GENETIC ANALYSIS OF LINKAGE GROUP I OF CHLAMYDOMONAS REINHARDI*

By

W. T. Ebersold** and R. P. Levine

With 2 Figures in the Text

*(Eingegangen am 18. Dezember 1958)*

The purpose of this study was to provide information concerning chiasma and chromatid interference in *Chlamydomonas reinhardi*. Earlier genetic studies with *C. reinhardi* using several morphological and physiological mutant characters and mating type have established 1. that these unit characters segregate in mendelian fashion (Smith and Regnery 1950, Sager 1955, Hartshorne 1955, Ebersold 1956, Eversole 1956), 2. one example of extra-chromosomal inheritance (Sager 1954), 3. the existence of two linkage groups (Ebersold 1956), and 4. several gene-centromere distances (Ebersold 1954, Sager 1955). Further, factors influencing the frequency of recombination between linked loci have been studied (Eversole and Tatum 1956, Levine and Ebersold 1958a, 1958b). Buffaloe (1958) has found the haploid chromosome number to be eight for this species.

Recently, studies were initiated to determine the linkage relationships of all the available mutant loci; thus far 23 loci have been located in seven linkage groups (Ebersold in ms). In the present report data are presented from a genetic analysis of linkage group I which contains four mutant loci and provides information concerning chiasma and chromatid interference.

## Material and Methods

Four mutant strains of *C. reinhardi* were used in this investigation. For growth, these strains require ornithine, citrulline or arginine (*arg–1*), arginine (*arg–2*), *p*-aminobenzoic acid (*pab–2*) or thiamin (*thi–3*), and have been described previously (Ebersold 1956, Eversole 1956).

Cultures were maintained at 26°C. under "Ken-Rad" 30 W Daylight fluorescent lamps at constant light intensity of 500 f.c.

A mineral medium composed of 100 ml. per liter Beijerinck's solution, 100 ml. per liter M/15 phosphate buffer pH 6.8, one ml. per liter trace element solution and 1.5 per cent agar is adequate for growth of strains possessing no growth-factor requirement and will be referred to as minimal medium. The composition of the various solutions may be found in Levine and Ebersold (1958a).

For the growth of mutant strains, minimal medium was supplemented with the following substances: For *arg–1*, 10 $\mu$g. per ml. ornithine, citrulline or arginine; for *arg–2*, 10 $\mu$g. per ml. arginine; for *pab–2*, 0.5 $\mu$g. per ml. *p*-aminobenzoic acid; for *thi–3*, one $\mu$g. per ml. thiamin.

* This work was supported by the United States Public Health Service (Grant No. E 1421) and the National Science Foundation (Grant No. G 2812).

** A portion of this work was conducted while a Public Health Service Research Fellow of the National Cancer Institute.

Test media were composed of minimal agar medium supplemented with various combinations of the substances listed above. These were minimal plus: arginine and *p*-aminobenzoic acid (designated as AP); arginine and thiamin (AT); *p*-aminobenzoic acid and thiamin (PT); ornithine, *p*-aminobenzoic acid and thiamine (OPT); and *p*-aminobenzoic acid, thiamin and 0.5 $\mu$g. per ml. arginine (0.5 APT).

Since *pab–2* and *thi–3* cells develop into small colonies on minimal medium, all test media were supplemented with growth-factor analogs at a concentration which inhibited growth of mutant but not of wild-type cells. One $\mu$g. per ml. sulfanilamide and 0.1 $\mu$g. per ml. oxythiamine plus 10 $\mu$g. per ml. pyrithiamine were added for selective inhibition of *pab–2* and *thi–3*, respectively. The effect of sulfanilamide was reversed by the addition of *p*-aminobenzoic acid to the medium. Similarly, the effect of oxythiamine and pyrithiamine was reversed by the addition of thiamin.

For mating, haploid cells from vegetative, palmelloid cultures of opposite mating type ($mt^+$ and $mt^-$) were suspended separately in sterile distilled water and were illuminated to induce motility and sexual competence. When the cell suspensions were mixed, cells of opposite mating type fused in pairs within 20 minutes to form diploid zygotes. The zygote suspension was then poured onto minimal medium, illuminated for 18 hours, and placed in darkness for five days. Following this period of maturation, zygotes were transferred to APT medium and were manipulated, singly, into the end of 3 mm. × 25 mm. rectangular lanes between parallel cuts in the agar (Fig. 1a). In order to kill the vegetative cells which were transferred with the zygotes, each plate was inverted for 35 seconds over a Petri dish containing chloroform. The zygotes were then illuminated for 18 hours. Under these conditions meiosis occurs and approximately 97 per cent germination of zygotes is obtained (Fig. 1b). Each zygote produced four or eight haploid cells which represent the products of meiosis. These were separated with the aid of a dissection microscope at 60× to form a row of cells three mm. apart within each lane (Fig. 1c).

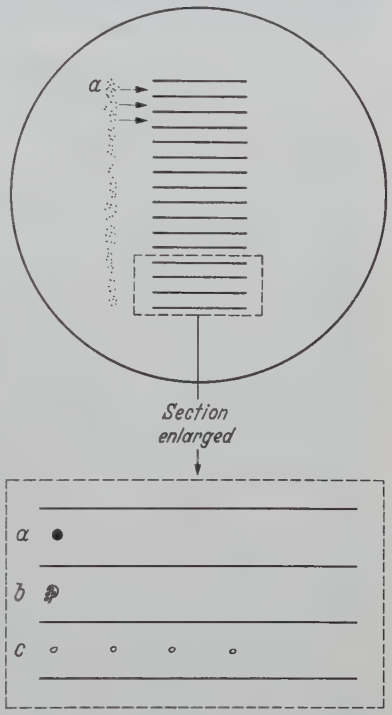



Fig. 1. The isolation of zygotes and zygote products. See text for explanation

Discrete colonies approximately 0.75 mm. in diameter developed from each cell after incubation in the light for six days. These were replica-plated by means of smooth-surfaced filter paper (Whatman number 1 or similar grade) to the following test media: Minimal, AP, AT, PT, OPT and 0.5 APT. The presence or absence of growth on the various test media after incubation for five days in the light was used as the criterion for determining the genotype of the cells in each colony. The medium 0.5 APT served to differentiate *arg–2* from *arg–1 arg–2* mutant cells, since all cells possessing *arg–1* bleach rapidly on media containing a suboptimal concentration of arginine.

## Results

Three crosses were made using the four linked loci *arg–1*, *arg–2*, *pab–2 and thi–3:*

1. *arg–1 arg–2* + +, $mt^-$ × + + *pab–2 thi–3*, $mt^+$
2. *arg–1* + + *thi–3*, $mt^+$ × + *arg–2 pab–2* +, $mt^-$
3. *arg–1* + + *thi–3*, $mt^-$ × + *arg–2 pab–2* +, $mt^+$

Hereafter these will be referred to as crosses 1, 2 and 3, respectively.

Table 1. *Summary of the number of zygotes isolated, the number ungerminated, the number lost, and the number of tetrads analyzed*

| | Cross 1 | Cross 2 | Cross 3 | Total |
|---|---|---|---|---|
| Number of zygotes isolated . . . . . | 220 | 767 | 902 | 1889 |
| Number of ungerminated zygotes . . . . . | 8 | 19 | 21 | 48 |
| Number of zygotes which produced 16 cells and number of tetrads in which only two products were recovered after replication . | 21 | 47 | 52 | 120 |
| Number of tetrads analyzed (included in Table 4) | 191 | 701 | 829 | 1721 |

Table 2. *Tetrad classes recovered from crosses 1, 2 and 3*

a) Cross 1, *arg–1 arg–2* + + × + + *pab–2 thi–3* (a–1 a–2 + + × + + p t)

| (1) | | | | (2) | | | | (3) | | | | (4) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | + |
| a–1 | a–2 | + | + | a–1 | + | p | t | a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | + | t |
| + | + | p | t | + | a–2 | + | + | + | + | + | + | + | + | p | + |
| + | + | p | t | + | + | p | t | + | + | p | t | + | + | p | t |

| (7) | | | | (8) | | | | (10) | | | | (11) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | t | a–1 | a–2 | + | + |
| a–1 | + | p | + | a–1 | + | p | t | a–1 | + | p | t | a–1 | a–2 | p | + |
| + | a–2 | + | t | + | a–2 | + | t | + | a–2 | + | + | + | + | + | t |
| + | + | p | t | + | + | p | + | + | + | p | + | + | + | p | t |

| (12) | | | | (13) | | | | (14) | | | | (15) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | a–2 | + | + | a–1 | a–2 | + | t | a–1 | a–2 | + | t | a–1 | a–2 | + | t |
| a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | p | + | a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | + | t |
| + | + | + | t | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | p | + |
| + | + | p | + | + | + | p | t | + | + | p | + | + | + | p | + |

| (20) | | | |
|---|---|---|---|
| a–1 | a–2 | p | + |
| a–1 | a–2 | p | t |
| + | + | + | + |
| + | + | + | t |

b) Crosses 2 and 3, *arg–1* + + *thi–3* × + *arg–2 pab–2* + (a–1 + + t × + a–2 p +)

| (1) | | | | (2) | | | | (3) | | | | (4) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | + | + | t | a–1 | + | + | t | a–1 | + | + | t | a–1 | + | + | t |
| a–1 | + | + | t | a–1 | a–2 | p | + | a–1 | + | p | + | a–1 | + | + | + |
| + | a–2 | p | + | + | + | + | t | + | a–2 | + | t | + | a–2 | p | t |
| + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | + |

| (5) | | | | (6) | | | | (7) | | | | (8) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | + | + | t | a–1 | + | p | + | a–1 | + | + | t | a–1 | + | + | t |
| a–1 | a–2 | + | t | a–1 | a–2 | + | t | a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | p | + |
| + | + | p | + | + | + | + | t | + | + | + | + | + | + | + | + |
| + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | t |

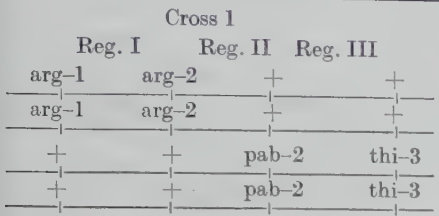
| (9) | | | | (10) | | | | (11) | | | | (12) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | + | + | + | a–1 | + | + | + | a–1 | + | + | t | a–1 | + | + | t |
| a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | p | + | a–1 | + | p | t | a–1 | + | p | + |
| + | + | + | t | + | + | + | t | + | a–2 | + | + | + | a–2 | + | + |
| + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | t | + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | t |

| (13) | | | | (14) | | | | (16) | | | | (17) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | + | + | + | a–1 | + | + | + | a–1 | + | p | + | a–1 | + | p | t |
| a–1 | + | p | t | a–1 | + | p | + | a–1 | a–2 | p | t | a–1 | a–2 | p | + |
| + | a–2 | + | t | + | a–2 | + | t | + | + | + | + | + | + | + | t |
| + | a–2 | p | + | + | a–2 | p | t | + | a–2 | + | t | + | a–2 | + | + |

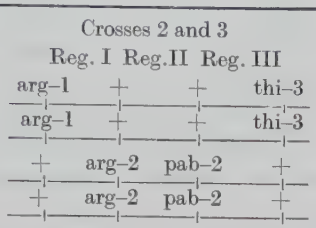
| (18) | | | | (19) | | | | (20) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a–1 | + | + | + | a–1 | + | + | + | a–1 | + | p | + |
| a–1 | a–2 | p | t | a–1 | + | p | t | a–1 | + | p | t |
| + | + | + | + | + | a–2 | + | + | + | a–2 | + | + |
| + | a–2 | p | t | + | a–2 | p | t | + | a–2 | + | t |

Table 3. *Classification of unordered tetrads obtained from crosses 1, 2, and 3.* Only the simplest possible crossover pattern is indicated

Cross 1




Crosses 2 and 3




| Tetrad class | Strands involved in exchange I | II | III | Number of tetrads Cross 1 | Cross 2 | Cross 3 | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 8 | 57 | 99 | 164 |
| 2 | b, c | 0 | 0 | 6 | 37 | 49 | 92 |
| 3 | 0 | b, c | 0 | 54 | 167 | 218 | 439 |
| 4 | 0 | 0 | b, c | 86 | 369 | 400 | 855 |
| 5 | b, c | b, c | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 6 | b, c | a, c | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | b, c | 0 | b, c | 5 | 7 | 7 | 19 |
| 8 | b, c | 0 | b, d | 2 | 10 | 11 | 23 |
| 9 | b, c | 0 | a, c | 0 | 6 | 8 | 14 |
| 10 | b, c | 0 | a, d | 10 | 5 | 11 | 26 |
| 11 | 0 | b, c | b, c | 2 | 9 | 11 | 22 |
| 12 | 0 | b, c | b, d | 6 | 10 | 3 | 19 |
| 13 | 0 | b, c | a, c | 3 | 10 | 6 | 19 |
| 14 | 0 | b, c | a,d | 6 | 5 | 6 | 17 |
| 15 | 0 | 0 | b, c; a, d | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 16 | b, c | a, d | b, c | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 17 | b, c | a, d | a, d | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 18 | i* | 0 | b, c; a, d | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 19 | 0 | i | b, c; a, d | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 20 | 0 | b. c; a, d, | i | 1 | 2 | 0 | 3 |
| | | | | 191 | 701 | 829 | 1721 |
| Number of tetrads included above in which only three products were recovered. (The fourth product was inferred.) | | | | 5 | 12 | 1 | 18 |

* Strands involved indeterminate.

From a total of 1889 zygotes isolated from the three crosses, the products from 1721 were analyzed. The remaining 168 either failed to germinate, produced 16 rather than four or eight cells, or two or more products were lost the replication procedure (see Table 1). In Table 2a the genotypes of the four meiotic products comprising each type of tetrad recovered from cross I are given. The genotypes of the cells found in tetrads from crosses 2 and 3 are shown in Table 2b.

Although linkage of the four loci and their sequence was established from crosses to be reported elsewhere, this information also can be obtained from the data presented in Table 2 and 3.

With respect to any two loci involved in the crosses listed above, three tetrad types are possible, parental ditype (0/4 strands recombinant), non-parental ditype (4/4 strands recombinant) and tetratype (2/4 strands recombinant). If two loci are not linked, parental ditype (PD) and non-parental ditype (NPD) tetrads are equally probable. However, if the number of PD tetrads exceed significantly the number of NPD tetrads, linkage between the two is established (Perkins 1953). When the PD:NPD ratio for each pair of loci is determined

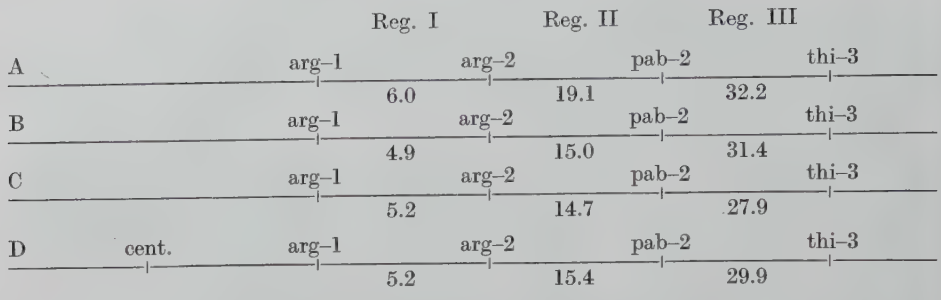



Fig. 2. Genetic maps of linkage group I. Maps A, B, C, and D were constructed from data from crosses 1, 2, 3, and data pooled from the three crosses, respectively

Table 4. *Number of detectable crossovers in each region summarized from Table 3, and the crossover frequency in each region*

| | Region | Crossovers per region | Crossover frequency |
|---|---|---|---|
| Cross 1 191 tetrads | I | 23 | 0.120 |
| | II | 73 | 0.382 |
| | III | 125 | 0.654 |
| Cross 2 701 tetrads | I | 70 | 0.099 |
| | II | 211 | 0.301 |
| | III | 441 | 0.629 |
| Cross 3 829 tetrads | I | 86 | 0.104 |
| | II | 244 | 0.294 |
| | III | 463 | 0.558 |
| Crosses 1, 2 and 3 1721 tetrads | I | 179 | 0.104 |
| | II | 528 | 0.307 |
| | III | 1029 | 0.598 |

Table 5. *Summary of tetrad data used to determine the position of the centromere in linkage group I.* PD = parental ditype tetrad, NPD = non-parental ditype tetrad, and T = tetratype tetrad

| | | *PD* | *NPD* | *T* | *Total* |
|---|---|---|---|---|---|
| Cross 4 | *arg–2 pab–2* + , *mt*⁻ × + + , *ac–31, mt*⁺ | | | | |
| | arg–2 pab–2 | 88 | 0 | 38 | 126 |
| | arg–2 ac–31 | 30 | 36 | 60 | 126 |
| | pab–2 ac–31 | 19 | 23 | 84 | 126 |
| Cross 5 | *arg–2 pab–2* + , *mt*⁻ × + + , *nic–1, mt*⁺ | | | | |
| | arg–2 pab–2 | 81 | 0 | 35 | 116 |
| | arg–2 nic–1 | 27 | 25 | 64 | 116 |
| | pab–2 nic–1 | 18 | 12 | 86 | 116 |

using data from any of the three crosses, it is found that the probability that it represents a random deviation from 1 : 1 is less than 0.001 in each case.

The order of the four loci was determined by estimating the length of the interval between each pair of loci. For each of the three crosses the gene order *arg–1 arg–2 pab–2 thi–3*, was found to agree with that reported elsewhere. After the gene order was determined it was then possible to assign a definite crossover pattern to each type of tetrad recovered as shown in Table 3. Only the simplest possible crossover pattern is shown for each tetrad class. The number of exchanges detected in each region and the crossover frequency is summarized in Table 4. From this information it is possible to construct the genetic maps shown in Fig. 2.

### Location of the Centromere in Linkage Group I

It is possible to determine centromere distances from the tetratype (T) frequencies obtained from the analysis of unordered tetrads involving three loci, two linked and one unlinked (Whitehouse 1957). Since it was of interest to know the position of the centromere relative to the four loci in the linkage group

studied, the double mutant, *arg-2 pab-2*, was crossed separately with *ac-31* and *nic-1* (Eversole 1956). These two loci are neither linked to *arg-2*, *pab-2*, nor to one another. The results of the two crosses are shown in Table 5. The data from cross 4 indicate that *arg-2* and *pab-2* are approximately 18 and 33 map units, respectively, from the centromere. The order then, is centromere *arg-2 pab-2*. This order is also indicated by the results from cross 5, which show that *arg-2* is approximately 24 map units from the centromere, *pab-2* 39, units. Thus, all of the loci used in crosses 1, 2 and 3 are located in the same arm of the chromosome as shown in Fig. 2.

## Chiasma Interference

Tetrad coincidence, the ratio of the observed frequency of tetrads which represent a double exchange in two given regions to the frequency expected on chance, was calculated using the following formula: $C = \frac{MN}{AB}$ (Weinstein 1955), where C is the coincidence; M, the number of tetrads which represent a double exchange; N, the total number of tetrads; A, the number of tetrads which represent at least a single exchange in one region; and B, the number of tetrads which represent at least a single exchange in the second region. Strand coincidence was calculated using the same formula, but the number of single-exchange, double-exchange and total number of strands was substituted in place of tetrads.

Table 6. *Coincidence values for the three chromosomal regions of linkage group I*

| Cross | Regions | Tetrad Coincidence | Strand Coincidence |
|---|---|---|---|
| 1 | I—II | 0 | 0 |
| | II—III | 0.39 | 0.31 |
| | I—III | 1.15 | 0.79 |
| 2 | I—II | 0.19 | 0.14 |
| | II—III | 0.31 | 0.36 |
| | I—III | 0.71 | 0.77 |
| 3 | I—II | 0 | 0 |
| | II—III | 0.19 | 0.26 |
| | I—III | 0.77 | 0.91 |

A summary of both tetrad and strand coincidence values calculated from the data from crosses 1, 2 and 3 and from the total data is given in Table 6. These values show that interference is positive within the arm of the chromosome studied and that interference decreases as the distance between exchanges increases. For the tetrad coincidence values, 4-strand double exchanges within a region were counted as singles (tetrad classes 15, 18, 19 and 20). As a result of employing this convention and as a result of undetected 2- and 3-strand double exchanges, coincidence is actually greater than the values given. However, alternate methods of calculation such as counting 4-strand double exchanges within a region as doubles, or omitting all tetrads resulting from a double exchange within a region, make very little difference in the coincidence values.

## Chromatid Interference

In the absence of chromatid interference the numbers of 2-, 3- and 4-strand double exchanges should occur in a random 1:2:1 ratio. In Table 7 the numbers of 2-, 3- and 4-strand double exchanges from the three crosses are summarized. For regions I–II the data are insufficient to give any information regarding strand relationships. The only departure from a random ratio is for cross 1, regions I–III ($X^2_2 = 8.4$, $P = 0.004$). However, the number of double exchanges

in this instance is small, and such a departure may have no real significance. For crosses 2 and 3, regions I–III the number of double exchanges is also small; therefore, the data from all three crosses are combined. Similarly, the data are combined for regions II–III. The data presented indicate that in regions I–III and II–III all four chromatids are involved at random in adjacent exchanges.

Table 7. *Strand relationships for pairs of exchanges (Only adjacent pairs are considered in triple-exchange tetrads)*

| | 2-strand | 3-strand | 4-strand | |
|---|---|---|---|---|
| *Regions II—III* | | | | |
| Cross 1 | 2 | 9 | 6 | |
| 2 | 10 | 20 | 6 | |
| 3 | 11 | 9 | 6 | |
| | 23 | 38 | 18 | |
| Expected | 19.75 | 39.50 | 19.75 | |
| $X_2^2 = 0.75$ | | | | |
| $P = 0.7$ | | | | |
| *Regions I—III* | | | | |
| Cross 1 | 5 | 2 | 10 | $P = 0.004$ |
| 2 | 7 | 16 | 5 | |
| 3 | 7 | 19 | 11 | |
| | 19 | 37 | 26 | |
| Expected | 20.50 | 41.00 | 20.50 | |
| $X_2^2 = 1.98$ | | | | |
| $P > 0.3$ | | | | |
| *Regions I—II* | | | | |
| Cross 2 | 1 | 1 | 2 | |
| Total | | | | |
| | 43 | 76 | 46 | |
| Expected | 41.25 | 82.50 | 41.25 | |
| $X_2^2 = 1.13$ | | | | |
| $P > 0.5$ | | | | |

Since 4-strand double exchanges occur within regions II and III, it is likely that undetected 2- and-3-strand doubles also occur within these regions. Although their frequency is unknown, some tetrads which were classed as double exchange tetrads could have resulted from triple exchanges. The occurence of these undetected exchanges would tend to randomize the frequency of apparent 2-, 3- and 4-strand double exchanges (Whitehouse 1942, 1957). It is possible, therefore, that chromatid interference does indeed exist in *C. reinhardi* but that it is obscured because of the relatively long genetic length of the intervals involved.

## Crossing Over at the 4-Strand Stage

Eversole and Tatum (1956) have reported that from a cross of *arg–1* × *arg–2* an excess of NPD tetrads was recovered. Among 224 tetrads analyzed three NPD tetrads were found. The number expected, assuming that chiasma and chromatid interference are absent, is 0.31 as determined by the method of Papazian (1952)[1]. They point out that such an excess could be result of negative chiasma interference or positive chromatid interference (in both cases an NPD tetrad results from a 4-strand double exchange), or of crossing over at the 2-strand stage less than one per cent of the time. Similar results were also obtained from crosses involving *arg–1* and two other mutant loci in linkage group I (Ebersold 1956).

[1] The formula given by Papazian, $NPD = \frac{T^2}{8}\left(1+\frac{2T}{3}\right)$, should read $NPD = \frac{T^2}{8}\left(1+\frac{3T}{2}\right)$ (Strickland 1958). The expected number of NPD tetrads recalculated is 0.36.

One purpose of the experiments reported here was to determine the phenomenon responsible for the reported excess NPD tetrads. It was reasoned that if all of the NPD segregations involving *arg–1* and *arg–2* were in excess of the number expected and if, among some of these tetrads, an additional exchange (representing a crossover at the 4-strand stage) could be found between *arg–2* and *pab–2* or *thi–3*, crossing over at the 2-strand stage could be ruled out. It would be unlikely that crossing over at the 2- and at the 4-strand stage could occur during the same meiotic event. Since no NPD segregations were found which involved *arg–1* and *arg–2* among the 1721 tetrads analyzed, a much larger number of tetrads was tested by using a zygote plating method (Levine and Ebersold 1958a).

Zygotes from the cross *arg–1 arg–2* + +, $mt^-$ × + + *pab–2 thi–3*, $mt^+$ (identical to cross 1) were plated on minimal medium supplemented with arginine, *p*-aminobenzoic acid and thiamin. The resulting colonies, which contained all four meiotic products, were then replica-plated to a test medium composed of minimal supplemented with *p*-aminobenzoic acid and thiamin. If a crossover at the 2-strand stage or a 4-strand double exchange occurred between *arg–1* and *arg–2*, a colony would fail to grow after replication since all of the cells in the tetrad would possess either *arg–1* or *arg–2*. Among the 12,286 tetrads tested in this manner no colonies were found which failed to develop on the test medium. Since no NPD segregations were found, it was not possible to determine the manner in which the excess NPD tetrads reported by Eversole and Tatum arose.

It is clear from the data in Table 3 that NPD segregations for regions II and III are not in excess. For region II the number expected, assuming interference to be absent, is 30, the number recovered, 3; for region III the number expected is 138, the number recovered, 5. It might be assumed that these NPD segregations resulted from a crossover at the 2-strand stage (tetrad classes 15, 18, 19, 20). However, in six of these tetrads (tetrad classes 18, 19, 20) crossing over at the 2-strand stage would have to be accompanied by a crossover at the 4-strand stage in one of the other two regions. There remain only two tetrads (tetrad class 15) among the total of 1721 which might have resulted from crossing over at the 2-strand stage. Although this can not be ruled out, crossing over at the 2-strand stage in *C. reinhardi* is no more likely than in any other organism in which NPD segregations have been found.

## Summary

Crossing over in linkage group I of *Chlamydomonas reinhardi* was studied by means of the analysis of 1721 unordered tetrads. The data indicate that chiasma interference is positive, that chromatid interference is absent and that crossing over occurs at the 4-strand stage.

## Zusammenfassung

Mit Hilfe der Analyse von 1721 ungeordneten Tetraden wurde das crossing-over in der Koppelungsgruppe I von *Chlamydomonas reinhardi* untersucht. Aus der Häufigkeit der verschiedenen Tetraden-Typen wird geschlossen, daß

crossingover im Vierstrang-Stadium geschieht, und daß eine positive Chiasma-Interferenz existiert, während eine Chromatiden-Interferenz nicht vorkommt.

**Acknowledgments.** The critical advice of Drs. A. Weinstein, R. W. Barratt, D. D. Perkins and W. N. Strickland and the technical assistance of Miss J. F. Ames is greatly appreciated.

## Literature

Buffaloe, N. D.: A comparative study of four species of Chlamydomonas. Bull. Torrey bot. Club **85**, 157 (1958). — Ebersold, W. T.: Crossing over in *Chlamydomonas reinhardi*. Amer. J. Bot. **43**, 408 (1956). — Eversole, R. A.:Biochemical mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. Amer. J. Bot. **43**, 404 (1956). — Eversole, R. A., and E. L. Tatum: Chemical alteration of crossing over frequency in Chlamydomonas. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. **42**, 68 (1956). — Hartshorne, J. N.: Multiple mutation in *Chlamydomonas reinhardi*. Heredity **9**, 239 (1955). — Levine, R. P., and W. T. Ebersold: The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas reinhardi*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 631 (1958a) — Gene recombination in *Chlamydomonas reinhardi*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **23** (1958b) (in press). — Papazian, H. P.: The analysis of tetrad data. Genetics **37**, 175 (1952). — Perkins, D. D.: The detection of linkage in tetrad analysis. Genetics **38**, 187 (1953). — Sager, R.: Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardi*. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. **40**, 356 (1954). — Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardi*. Genetics **40**, 476 (1955). — Smith, G. M., and D. C. Regnery: Inheritance of sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*. Proc. nat. Acad. Sci. U. S. **36**, 246 (1950). — Strickland, W. N.: An analysis of interference in *Aspergillus nidulans*. Proc. roy. Soc. B. **149**, 82 (1958). — Weinstein, A.: Unraveling the chromosomes. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl. 2, 249 (1955). — Whitehouse, H. L.: Crossing over in Neurospora. New Phytologist **41**, 23 (1942). — Mapping chromosome centromeres from tetratypes requencies. J. Genet. **55**, 348 (1957).

Dr. W. T. Ebersold and Dr. R. P. Levine,
Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 83—93 (1959)

Aus dem Zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich

# BIOMETRISCHER VERGLEICH ZWEIER POPULATIONEN VON DROSOPHILA OBSCURA

Von

A. Kälin und H. Burla

*(Eingegangen am 24. Dezember 1958)*

In einer früher veröffentlichten Arbeit[1] wurde über Muster aus zwei schweizerischen Populationen von *Drosophila obscura* berichtet, die sich in einigen quantitativen Merkmalen voneinander unterscheiden. Für jedes Merkmal gesondert wurde der Unterschied zwischen den beiden Mustern mit dem $t$-Test auf seine statistische Sicherung hin geprüft. Ferner wurde für jede Population die Korrelation zwischen den Merkmalen berechnet. Bei einem weiteren Muster aus einer der beiden Populationen wurde durch eine einfache Streuungszerlegung geprüft, in welchem Maß die Merkmale umweltsabhängig oder erbbedingt sind. In der vorliegenden Arbeit werden nun Prüfverfahren angewandt, bei denen der Nachdruck nicht auf den einzelnen Merkmalen für sich, sondern auf ihrer Gesamtheit sowie ihrer gegenseitigen Abhängigkeit liegt.

## I. Verallgemeinerte Distanz zwischen den beiden Populationen

Die Fliegen stammen von den zwei Orten Bex und Vorauen, die in der Luftlinie 170 km weit auseinander liegen. Von jedem der 93 ($N'$) in Bex und der 100 ($N''$) in Vorauen gefangenen Weibchen wurde ein Männchen der ersten Nachkommengeneration für die Zählungen und Messungen verwendet. Weitere Einzelheiten bezüglich Fangplätze und Zuchtmethoden wurden früher beschrieben[1]. Von den ursprünglich sieben berücksichtigten Merkmalen wurden drei ausgeschieden und nur die folgenden vier für die weitere Bearbeitung beibehalten:

$x_1$ = Anzahl Geschlechtskammborsten,
$x_2$ = Anzahl Costalborsten,
$x_3$ = Anzahl Forcepszähne,
$x_4$ = Flügellänge, in Einheiten von 13,7 $\mu$.

In Tabelle 1 sind gesondert für jede Population die Durchschnittswerte $\bar{x}_i$, die Elemente $s_{ij}$ der Dispersionsmatrix $S = (s_{ij})$ und die mittleren quadratischen Abweichungen aufgeführt. Die Elemente $s_{ij}$ sind Kovarianzen und berechnen sich für jedes Merkmalspaar $i, j$ nach

$$s_{ij} = \sum_{k=1}^{N} (x_{ik} - \bar{x}_i)(x_{jk} - \bar{x}_j)/(N-1).$$

Da $s_{ji} = s_{ij}$, z. B. $s_{31} = s_{13}$, ist in Tabelle 1 nur die obere Hälfte der Dispersionsmatrix wiedergegeben.

Für die folgenden Überlegungen treffen wir die plausibe Annahme, daß die beiden Dispersionsmatrizen $(s'_{ij})$ und $(s''_{ij})$ — von zufälligen Unterschieden abgesehen — gesamthaft im wesentlichen übereinstimmen. Ohne diese Annahme geprüft zu haben (z. B. mit Hilfe des Tests von Wilks[15]), setzen wir also voraus, daß die beiden Stichproben von Bex und Vorauen aus Grundgesamtheiten mit

identischen Grundstreuungen und identischen Korrelationen zwischen den einzelnen Merkmalen stammen und daß sie sich höchstens in den einzelnen Durchschnittswerten der Variablen unterscheiden. In Analogie zu Tabelle 1 bilden wir dann die Tabelle 2, in der wir jedoch die Durchschnittswerte $\bar{x}_i$ ersetzen durch die Differenzen der Durchschnittswerte von Bex und Vorauen:

$$d_i = \bar{x}'_i - \bar{x}''_i, \qquad i = 1, \ldots, 4.$$

Tabelle 1. *Durchschnittswerte $\bar{x}_i$, Dispersionsmatrizen $S = (s_{ij})$ und mittlere quadratische Abweichungen $s_i$ der vier Merkmale $x_1, \ldots, x_4$, gesondert für die beiden Muster Bex und Vorauen*

| | Geschlechtskammborsten $x_1$ | Costalborsten $x_2$ | Forcepszähne $x_3$ | Flügellänge $x_4$ |
|---|---|---|---|---|
| *Bex* $N' = 93$ | $\bar{x}'_1 = 26{,}57$ | $\bar{x}'_2 = 24{,}12$ | $\bar{x}'_3 = 17{,}42$ | $\bar{x}'_4 = 177{,}473$ |
| | $s'_{11} = 5{,}748$ | $s'_{12} = 1{,}791$<br>$s'_{22} = 7{,}323$ | $s'_{13} = -0{,}002$<br>$s'_{23} = -0{,}278$<br>$s'_{33} = 2{,}507$ | $s'_{14} = 1{,}891$<br>$s'_{24} = 1{,}031$<br>$s'_{34} = 1{,}224$<br>$s'_{44} = 26{,}535$ |
| | $s'_1 = 2{,}397$ | $s'_2 = 2{,}710$ | $s'_3 = 1{,}583$ | $s'_4 = 5{,}151$ |
| *Vorauen* $N'' = 100$ | $\bar{x}''_1 = 27{,}43$ | $\bar{x}''_2 = 25{,}64$ | $\bar{x}''_3 = 17{,}63$ | $\bar{x}''_4 = 188{,}86$ |
| | $s''_{11} = 4{,}409$ | $s''_{12} = -0{,}025$<br>$s''_{22} = 6{,}637$ | $s''_{13} = 0{,}110$<br>$s''_{23} = 0{,}492$<br>$s''_{33} = 1{,}751$ | $s''_{14} = -1{,}202$<br>$s''_{24} = 1{,}980$<br>$s''_{34} = 0{,}614$<br>$s''_{44} = 30{,}101$ |
| | $s''_1 = 2{,}100$ | $s''_2 = 2{,}576$ | $s''_3 = 1{,}323$ | $s''_4 = 5{,}487$ |

Als Schätzung $S = (s_{ij})$ der gemeinsamen Dispersion in der Grundgesamtheit berechnet man einen gewogenen Durchschnitt der Dispersionsmatrizen $S' = (s'_{ij})$ und $S'' = (s''_{ij})$ der beiden Stichproben nach der Formel:

$$s_{ij} = [(N' - 1)s'_{ij} + (N'' - 1)s''_{ij}]/(N' + N'' - 2).$$

Ferner berechnet man die mittleren quadratischen Abweichungen $s_i = \sqrt{s_{ii}}$ der einzelnen Merkmale für die beiden Muster zusammen (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Differenzen $d_i$ der Durchschnittswerte und Dispersionsmatrix $S = (s_{ij})$ (innerhalb von Mustern) sowie mittlere quadratische Abweichungen $s_i$ der vereinigten Muster Bex und Vorauen*

| Geschlechtskammborsten $x_1$ | Costalborsten $x_2$ | Forcepszähne $x_3$ | Flügellänge $x_4$ |
|---|---|---|---|
| $d_1 = 0{,}86$ | $d_2 = 1{,}522$ | $d_3 = 0{,}211$ | $d_4 = 11{,}387$ |
| $s_{11} = 5{,}054$ | $s_{12} = 0{,}849$<br>$s_{22} = 6{,}967$ | $s_{13} = 0{,}056$<br>$s_{23} = 0{,}121$<br>$s_{33} = 2{,}115$ | $s_{14} = 0{,}288$<br>$s_{24} = 1{,}025$<br>$s_{34} = 0{,}908$<br>$s_{44} = 28{,}383$ |
| $s_1 = 2{,}248$ | $s_2 = 2{,}640$ | $s_3 = 1{,}454$ | $s_4 = 5{,}328$ |

Die Matrix $(s_{ij})$ bildet zusammen mit den Differenzen $d_1, \ldots, d_4$ die wichtigste Grundlage für die weiteren Berechnungen.

Der Vollständigkeit halber können noch die Korrelationen zwischen den einzelnen Merkmalen innerhalb Mustern berechnet werden nach der Formel $r_{ij} = s_{ij}/(s_i s_j)$, $r_{ii} = 1$. Diese Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 3 verzeichnet. Aus der Tabelle geht hervor, daß mit Ausnahme einer einzigen Kombination die Merkmale nicht korreliert sind, wenigstens nicht im Rahmen des Umfangs

der beiden Muster. Damit erfüllen sie eine Bedingung, die bei ihrer Auswahl an sie gestellt wurde. Die schwach gesicherte Korrelation zwischen Geschlechtskammborsten und Costalborsten beruht darauf, daß im Muster von Bex diese Merkmale gut gesichert korreliert erscheinen, während eine solche Korrelation im Muster von Vorauen fehlt. Welche Bedeutung dieser Unstimmigkeit zwischen den beiden Mustern zukommt, ist noch unklar.

In der früheren Arbeit wurde gefunden, daß sich die beiden Muster auf Grund der Merkmale $x_1, x_2$ und $x_4$ einzeln genommen stark bis sehr stark unterscheiden, während sich hinsichtlich der Anzahl der Forcepszähne $x_3$ kein gesicherter Unterschied ergab. Eine Verallgemeinerung des in jener Arbeit verwendeten $t$-Tests, der man, obwohl sie nicht restlos befriedigt, auch heute noch gelegentlich begegnet, ist der von Karl Pearson im Jahre 1921 vorgeschlagene „coefficient of racial likeness", der lautet:

Tabelle 3. *Korrelationskoeffizienten zwischen Merkmalen innerhalb Mustern*

| | $x_1$ | $x_2$ | $x_3$ | $x_4$ |
|---|---|---|---|---|
| $x_1$ | 1,000 | 0,143* | 0,017 | 0,024 |
| $x_2$ | | 1,000 | 0,031 | 0,073 |
| $x_3$ | | | 1,000 | 0,117 |
| $x_4$ | | | | 1,000 |

$$\mathrm{CRL} = \frac{N' N''}{N' + N''} \frac{1}{p} \sum_{i=1}^{p} \frac{d_i^2}{s_{ii}} .$$

Als statistische Maßzahl in Verbindung mit einem Test ist diese Größe nur brauchbar, wenn die einzelnen Merkmale nicht oder nur wenig miteinander korreliert sind. Da dies beim vorliegenden Material weitgehend zutrifft, würde man erhalten CRL = 61,051. Auf die Diskussion dieser Maßzahl soll hier nicht eingegangen werden, da sie die gegenseitige Abhängigkeit der Merkmale nicht berücksichtigt. Besser bildet man den Ausdruck

$$D_p^2 = \sum_{i=1}^{p} \sum_{j=1}^{p} s^{ij} d_i d_j .$$

Diese von Mahalanobis[7] 1936 eingeführte Größe hat die Bedeutung einer Distanz (genauer des Quadrats einer Distanz) zwischen den beiden Mustern. Diese Distanz wird allerdings gemessen in einem schiefwinkligen Koordinatensystem, in welchem die Maßeinheiten längs der Achsen und die Winkel zwischen den Achsen bestimmt werden durch die Dispersionsmatrix $(s_{ij})$, genauer durch deren inverse Matrix $S^{-1} = (s_{ij})^{-1}$, welche wir mit $(s^{ij})$ bezeichnen. Es gilt auch hier $s^{ji} = s^{ij}$. Für ein einziges Merkmal ($p = 1$) besteht die Matrix $S = (s_{ij})$ aus einem einzigen Element $s_{ii}$ und die inverse Matrix wird durch das Element $1/s_{ii}$ dargestellt; es ist in diesem Fall also $D^2$ von der Form $d_i^2/s_{ii}$, wie oben angegeben.

Das Aussehen der inversen Matrix $(s^{ij})$ für $p > 1$ hängt ab von der Anzahl und Auswahl der zur Charakterisierung der beiden Populationen verwendeten Variabeln. Geht man von den vier Variabeln $x_1, \ldots, x_4$ aus, so ergibt sich als inverse Matrix $S^{-1} = (s^{ij})$ der Matrix $S = (s_{ij})$ in Tabelle 2 die Matrix der Tabelle 4.

Tabelle 4. *Inverse Matrix $S^{-1} = (s_{ij})$ der Dispersionsmatrix $S = (s_{ij})$*

| | | | |
|---|---|---|---|
| $s^{11} = 0{,}202066$ | $s^{12} = -0{,}024416$ | $s^{13} = -0{,}003500$ | $s^{14} = -0{,}001054$ |
| $s^{21} = -0{,}024416$ | $s^{22} = 0{,}147322$ | $s^{23} = -0{,}005668$ | $s^{24} = -0{,}004891$ |
| $s^{31} = -0{,}003500$ | $s^{32} = -0{,}005668$ | $s^{33} = 0{,}479717$ | $s^{34} = -0{,}015102$ |
| $s^{41} = -0{,}001054$ | $s^{42} = -0{,}004891$ | $s^{43} = -0{,}015102$ | $s^{44} = 0{,}035902$ |
| $d_1 = 0{,}86$ | $d_2 = 1{,}522$ | $d_3 = 0{,}211$ | $d_4 = 11{,}387$ |

Um $D_4^2$ zu berechnen, schreibt man wie in Tabelle 4 die Größen $d_1, \ldots, d_4$ unter die Elemente $s^{ij}$ der inversen Matrix; bildet man für jede der vier Zeilen von $S^{-1}$ die Summe der Produkte der $s_{ij}$ mit den darunter stehenden $d_j$

$$\sum_{j=1}^{4} d_j \, s^{ij} = d^i, \qquad i = 1, \ldots, 4,$$

so erhält man die vier Größen $d^i$ und schließlich

$$D_4^2 = \sum_{i=1}^{4} d_i \, d^i.$$

Im vorliegenden Fall ergibt sich also zunächst

$$d^1 = 0{,}123877 \qquad d^2 = 0{,}146295 \qquad d^3 = -0{,}082550 \qquad d^4 = 0{,}397282$$

und hieraus, durch Multiplikation mit

$$d_1 = 0{,}86 \qquad d_2 = 1{,}522 \qquad d_3 = 0{,}211 \qquad d_4 = 11{,}387$$

und Summation schließlich $D_4^2 = 4{,}8356$.

Um nun zu untersuchen, ob der Unterschied zwischen den beiden Populationen auf Grund aller $p = 4$ Merkmale gesichert ist, wird man nach einer analog gebildeten Größe wie der früher[1] für die einzelnen Merkmale für sich gültigen Größen $t_i^2$ suchen, welche für eine Anzahl von $p$ Merkmalen lautet (verallgemeinertes $T$ von Hotelling[6])

$$T_p = \frac{N' N''}{N' + N''} \frac{1}{p} D_p^2,$$

die im vorliegenden Fall ($N' = 93$, $N'' = 100$, $p = 4$) den Wert hat

$$T_4 = \frac{93 \times 100}{193} \cdot \frac{1}{4} 4{,}8356 = 58{,}2525.$$

Für $p = 1$ bemerkt man, daß $T_1$ mit $t^2$ für das in Frage stehende Merkmal zusammenfällt.

Geht man nun von der zu prüfenden Hypothese aus, daß hinsichtlich aller Durchschnittswerte der $p = 4$ Merkmale zwischen den beiden Populationen kein gesicherter Unterschied besteht, so kann man diese Hypothese prüfen durch Berechnen der Testgröße

$$F = \frac{N' + N'' - p - 1}{N' + N'' - 2} \, T_p,$$

welche der bekannten statistischen $F$-Verteilung mit $p$ und $(N' + N'' - p - 1)$ Freiheitsgraden folgt. Im vorliegenden Fall wird diese Testgröße

$$F = \frac{188}{191} \cdot 58{,}2525 = 57{,}337,$$

während die Freiheitsgrade 4 und 188 betragen. Da für 4 und 200 Freiheitsgrade in der $F$-Verteilung bereits der Wert 3,41 zufällig nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% überschritten wird, kann der Unterschied der beiden *D. obscura*-Populationen von Bex und Vorauen als statistisch gesichert bezeichnet werden. Dies bestätigt die früher auf Grund der einzelnen Merkmale gefundenen Ergebnisse; die Aussage ist aber in dem Sinn schlüssiger, als nun auch der gegenseitigen Abhängigkeit der Merkmale Rechnung getragen wurde.

## II. Wahl eines minimalen Satzes von Merkmalen zur Unterscheidung der beiden Populationen

Man kann die Frage prüfen, ob $p$ Merkmale eine gleich gute Trennung zweier Populationen erlauben wie $p+q$ Merkmale, indem man die Größe

$$R = \frac{1+c\,D^2_{p+q}}{1+c\,D^2_p}, \text{ wobei } c = \frac{N'N''}{(N'+N'')(N'+N''-2)}$$

bildet[13]. Wird dann der Ausdruck $(R-1)$ und hieraus weiter die Größe

$$F = \frac{N'+N''-p-q-1}{q}(R-1)$$

berechnet, so ist letztere Größe verteilt wie $F$ mit $q$ und $(N'+N''-p-q-1)$ Freiheitsgraden.

Setzt man im vorliegenden Fall $p+q=4$, so wird man möglichst bald eine Testgröße $F$ zu erreichen suchen, die nicht mehr signifikant ist, denn dann hat man einen Satz von $p$ Variabeln, dessen Aussagefähigkeit bezüglich der Trennung der zwei Populationen durch $q$ weitere Variabeln nicht mehr wesentlich erhöht werden kann. Dies bedeutet, daß man, mit $p=1$ und daher $q=3$ beginnend, für die Berechnung des $D^2_1$ im Nenner von $R$ dasjenige der vier Merkmale benutzen wird, das $D^2_1$ möglichst groß und damit $(R-1)$ möglichst klein macht. Da $D^2_p$ bei Betrachtung eines einzigen Merkmals $i$ die Form $d_i^2/s_{ii}$ annimmt, läßt sich das Merkmal, welches für sich allein die beste Trennung bewirkt, als dasjenige feststellen, welches den größten Wert von $d_i^2/s_{ii}$ ergibt. $d_i$ ist wie früher die Differenz der Durchschnittswerte der Stichproben aus den beiden Populationen, $s_{ii}$ die mittlere gewogene Streuung des Merkmals $i$ um die bezüglichen Durchschnitte in den beiden Populationen, also die Streuung „innerhalb" Populationen. Die verallgemeinerten Distanzen $D_i^2$ sind in Tabelle 5 eingetragen.

Tabelle 5. *Verallgemeinerte Distanzen $D_i^2 = d_i^2/s_{ii}$ für jedes einzelne der vier Merkmale $x_1, \ldots, x_4$*

| Merkmal $x$ | $d_i$ | $s_{ii}$ | $D_i^2$ |
|---|---|---|---|
| Anzahl Geschlechtskammborsten | 0,86 | 5,054 | 0,147 |
| Anzahl Costalborsten . . . . . | 1,522 | 6,967 | 0,332 |
| Anzahl Forcepszähne . . . . . | 0,211 | 2,115 | 0,021 |
| Flügellänge . . . . . | 11,387 | 28,383 | 4,568 |

Als erstes Merkmal der gesuchten minimalen Reihe von Merkmalen wird die Flügellänge verwendet, da für diese das $D_i^2$ von allen vier Merkmalen am größten ist. Die Größe $R$ lautet, da $D^2_{p+q} = D^2_4 = 4{,}836$ und $c = (93 \times 100)/(193 \times 191) = 0{,}252285$

$$R = \frac{1+0{,}252285\times 4{,}836}{1+0{,}252285\times 4{,}568} = 1{,}031170,$$

woraus $R-1 = 0{,}03117$ und $F = \frac{188}{3}\cdot 0{,}03117 = 1{,}935$, was mit 3 und 188 Freiheitsgraden nicht gesichert ist. Das Merkmal Flügellänge liefert also für sich allein bereits eine verallgemeinerte Distanz, die gegenüber der auf vier Merkmalen beruhenden nur unwesentlich kleiner ist. Mit dem einen Merkmal allein läßt sich also eine etwa gleich gute Trennung der beiden Populationen erreichen wie mit allen vier Merkmalen zusammen.

Selbstverständlich hat diese Aussage nur Gültigkeit einerseits für die beiden betrachteten *D. obscura*-Muster von Bex und Vorauen und anderseits für die in Betracht gezogene Auswahl von vier Variabeln. Es könnte sein, daß ein unter den obigen Variabeln nicht berücksichtigtes Merkmal existiert, das mit den bisherigen vier zusammen ein relativ großes $D_5^2$ liefert, und daß dann der Minimalsatz von Variabeln zu erweitern wäre.

Um zu untersuchen, ob die beiden Populationen auch auf Grund der drei übrigen Variabeln getrennt werden können, ist es angezeigt, versuchsweise die Flügellänge beiseite zu lassen. Es ergibt sich dann für die drei übrigen Merkmale ein $D_3^2 = 0{,}439366$ und $F_{3,189} = \frac{189}{191} T_p = 6{,}983$, welches hoch gesichert ist, wenn auch nicht wie das $F$ von 57,337 wie bei Einbeziehung der Flügellänge. Soll nun erneut der minimale Satz an Variabeln bestimmt werden, so greift man zunächst die Costalborsten als dasjenige Merkmal heraus, das neben der Flügellänge in Tabelle 5 das größte $D_i^2$ erreicht und demnach am meisten zur Unterscheidung der beiden Populationen beiträgt. Es berechnet sich dann

$$R = \frac{1 + c \times 0{,}439366}{1 + c \times 0{,}332} = 1{,}024993 \quad \text{und}$$

$$R = 0{,}024993 \quad \text{sowie schließlich}$$

$$F_{2,189} = \frac{189}{2} R = 2{,}362.$$

Dieses $F$ ist nicht signifikant, was bedeutet, daß auch das Merkmal der Costalborsten die beiden Muster ausreichend trennt und die anderen beiden Merkmale nicht wesentlich zur Trennung beitragen.

### III. Das Trennverfahren nach Fisher

Zur Unterscheidung von Formen wird häufig das Trennverfahren (discriminatory analysis) nach Fisher[2] angewendet. Es hat seinen besonderen Wert für die Klassifikation von Einzelindividuen, ein Gesichtspunkt, der für die vorliegende Arbeit allerdings nicht von Bedeutung war. Nach Fisher verwendet man die vier Merkmalsvariabeln $x_1, \ldots, x_4$ unter der Form einer sog. Trennfunktion

$$X = l_1 x_1 + l_2 x_2 + l_3 x_3 + l_4 x_4.$$

Die gewünschte optimale Trennung der beiden Muster ergibt sich, wenn man für die $x_1, \ldots, x_4$ die Durchschnittswerte der Merkmalsvariabeln in den beiden Mustern in $X$ einsetzt und für die $l_1, \ldots, l_4$ die schon auf S. 86 benutzten Koeffizienten $d^1, \ldots, d^4$ verwendet. Es zeigt sich, daß die Differenz $\bar{X}' - \bar{X}''$ der so erhaltenen Werte von $X$ für die beiden Muster mit dem früher gefundenen $D_4^2 = 4{,}8356$ der verallgemeinerten Distanz nach Mahalanobis für vier Merkmale übereinstimmt.

Der Unterschied der Durchschnittswerte $\bar{X}'$ und $\bar{X}''$ der beiden Populationen kann mittels einer Streuungszerlegung geprüft werden: die Summe der Quadrate zwischen den Mustern ist $\frac{N'N''}{N'+N''}(\bar{X}' - \bar{X}'')^2$, an Stelle dessen man, wenn man für $X$ die obige lineare Kombination einführt und $\bar{x}_i' - \bar{x}_i'' = d_i$ setzt, auch $\frac{N'N''}{N'+N''}\left(\sum_{i=1}^{4} l_i d_i\right)^2 = \frac{N'N''}{N'+N''} D^4$ schreiben kann. Die Summe der Quadrate von $X$ innerhalb Mustern in der Streuungszerlegung ist gegeben durch $\sum_{i=1}^{4} \sum_{j=1}^{4} l_i l_j S_{ij}$, wo $S_{ij}$ die Summe der Produkte der beiden Variabeln $x_i$ und $x_j$ innerhalb Mustern ist und numerisch durch Multiplikation der Werte $s_{ij}$ in Tabelle 2 mit dem Frei-

heitsgrad $N'+N''-2=191$ erhalten werden kann; zahlenmäßig ergibt sich diese Summe der Quadrate unmittelbar, indem man das oben gefundene $D^2$ mit 191 multipliziert. Zufolge der Analogie des Problems der Bestimmung der Trennfunktion mit einem Regressionsproblem für den Fall zweier Populationen[3] kommen bei $p$ Merkmalen der Summe der Quadrate „zwischen" bzw. „innerhalb" Populationen $p$ bzw. $(N'+N''-p-1)$ Freiheitsgrade zu. Die Streuungszerlegung lautet dann:

| Streuung | $FG$ | $SQ$ | $DQ$ |
|---|---|---|---|
| Zwischen Populationen | 4 | $\frac{100 \times 93}{193} D^4 = 1126{,}695$ | 281,674 |
| Innerhalb Populationen | 188 | $191 \times D^2 = 923{,}596$ | 4,913 |

Der Unterschied zwischen den beiden Mustern erweist sich bei einem $F_{4,188} = \frac{281{,}674}{4{,}913} = 57{,}332$ als stark gesichert. Dieser Wert von $F$ stimmt erwartungsgemäß mit demjenigen zur Prüfung der verallgemeinerten Distanz nach Mahalanobis überein.

Wenn beabsichtigt wäre, ein Individuum, von dem nur bekannt ist, daß es aus einer der beiden Populationen stammt, aber nicht aus welcher, zu klassifizieren, so würde man die Trennfunktion $X$ für die Werte $x_1, \ldots, x_4$ des betreffenden Individuums berechnen. Je nachdem dieser Wert größer oder kleiner als das Mittel $(\bar{X}'+\bar{X}'')\,2$ der Durchschnittswerte von $X$ der beiden Populationen ausfiele, wäre das Individuum dem Muster mit dem größeren bzw. kleineren Durchschnitt $\bar{X}$ zuzuordnen. Unter der Annahme einer Normalverteilung von $X$ ergibt sich die Wahrscheinlichkeit einer Fehlklassifikation für irgend eine der Populationen wie z. B. diejenige mit dem Durchschnitt $\bar{X}'$ aus dem Vergleich von $\left|\bar{X}' - \frac{\bar{X}'+\bar{X}''}{2}\right| = \left|\bar{X}' - \bar{X}''\right|/2 = D^2/2 = 2{,}418$ mit der Standardabweichung der Normalverteilung, welche sich nach der obigen Streuungszerlegung auf $\sqrt{4{,}913} = 2{,}216$ beläuft. Die Normalabweichung mit Mittelwert Null und Einheitsstreuung lautet $2{,}418/2{,}216 = 1{,}091$, ein Wert, der, wie die Theorie zeigt, für große Stichproben praktisch mit $D/2$ übereinstimmt und im vorliegenden Fall für jedes der beiden Muster Fehlklassifikationen im Ausmaß von etwa 14% erwarten läßt.

## IV. Diskussion

### *a) Statistischer Teil*

Was die mathematisch-statistische Methodik zur Erfassung von Rasseunterschieden betrifft, so erschien es uns gerade im Hinblick auf den adaptativen Charakter der Merkmale nötig, nicht nur auf ein einziges Merkmal oder auf verschiedene Merkmale für sich betrachtet abzustellen, sondern ein Verfahren anzuwenden, das die verschiedenen Merkmale in ihrer gegenseitigen Abhängigkeit berücksichtigt.

Als mathematische Hilfsmittel, die Divergenz zweier Populationen zu beschreiben, existieren zur Zeit als wichtigste dasjenige der verallgemeinerten Distanz nach Mahalanobis für das Maß des gegenseitigen Abstandes der Populationen und dasjenige der Trennfunktion nach Fisher. Mathematisch sind die

beiden Verfahren aufs engste miteinander verwandt; in der Zielsetzung unterscheiden sie sich aber, indem das erste als ein statistisches Schätzungsverfahren zu bezeichnen ist, das den Abstand der beiden Populationen zu schätzen und nach statistischen Kriterien zu beurteilen sucht, während man beim zweiten Verfahren eher an eine Entscheidung im Sinne der Zuordnung eines Individuums zur einen oder anderen Population und an das Risiko allfälliger Fehlklassifikationen denkt. Naturgemäß steht in der vorliegenden Arbeit der erste Gesichtspunkt im Vordergrund, während die Methode der Trennfunktion nur der methodischen Vollständigkeit halber Erwähnung fand. Bemerkt sei, daß die in dieser Arbeit verwendeten Methoden stark dem Fall von nur zwei Populationen angepaßt sind, daß jedoch Verallgemeinerungen für mehr als zwei Populationen existieren.

Im vorliegenden Zusammenhang wird auf die Voraussetzungen, wie Normalität der mehrdimensionalen Verteilungen und, bis auf zufällige Unterschiede, Gleichheit der Dispersionsmatrizen in beiden Mustern, die besonders für die Anwendung der Prüfverfahren von Bedeutung sind, nicht weiter eingegangen. Hingegen sei hier, anschließend an die Ergebnisse von Kapitel II, generell die Frage nach der vorteilhaftesten Wahl der Variabeln zur Trennung zweier Populationen kurz besprochen. Es ist selbstverständlich, daß sich die Wahl der Merkmale in erster Linie nach den biologischen Gegebenheiten und nach der biologischen Problemstellung richtet. Hat man sich einmal für einen bestimmten Satz von Merkmalen entschieden, so kann die in Kapitel II beschriebene Methode dazu dienen, diesen Merkmalssatz auf die zur Trennung der Populationen wesentlichen Merkmale zu reduzieren und diejenigen Merkmale, die zusätzlich zu den übrigen Merkmalen nur eine unwesentliche Erhöhung der verallgemeinerten Distanz bewirken, zu eliminieren.

Umgekehrt läßt sich das beschriebene Verfahren der Reduktion des Variabelnsatzes im Prinzip auch dazu verwenden, ausgehend von einer oder einigen wenigen Variabeln, den Merkmalssatz schrittweise so zu erweitern, daß die Zunahme $D^2_{p+1} - D^2_p$, $p = 1, 2, \ldots$, der verallgemeinerten Distanz jeweils möglichst groß wird. Man findet in der Literatur für diesen Fall die Empfehlung, stark korrelierte Merkmale zu wählen. Bedeuten somit, für ein bestimmtes Merkmal $x_1$, $d_1$ und $s_1$ die Differenz der Durchschnittswerte für die beiden Muster und die Streuung innerhalb Mustern für dieses Merkmal, und sind $d_2$ und $s_2$ die analogen Größen für ein zweites Merkmal $x_2$, so gilt, wenn $r$ den Korrelationskoeffizienten der beiden Merkmale bedeutet,

$$D_1^2 = \frac{d_1^2}{s_1^2}, \quad D_2^2 = \frac{1}{1-r^2}\left(\frac{d_1^2}{s_1^2} - 2r\,\frac{d_1}{s_1}\,\frac{d_2}{s_2} + \frac{d_2^2}{s_2^2}\right),$$

woraus

$$D_2^2 - D_1^2 = \frac{1}{1-r^2}\left(r\,\frac{d_1}{s_1} - \frac{d_2}{s_2}\right)^2.$$

Da man von einem fest bleibenden Merkmal $x_1$ ausgeht, stimmt $(D_2^2 - D_1^2)$ bis auf einen konstanten Faktor mit der in Kapitel II eingeführten Testgröße $(R-1)$ überein. Zunächst zeigt sich, daß die Zunahme von $D_1^2$ bei Einführung eines weiteren Merkmals jedenfalls nicht negativ ist. Wird $r > 0$ und gegen 1 strebend angenommen, so strebt der Nenner $1 - r^2$ gegen 0 und es hängt vom Wert des Zählers $\left(r\,\frac{d_1}{s_1} - \frac{d_2}{s_2}\right)^2$ ab, ob die Zunahme von $D_1^2$ endlich bleibt oder unendlich

wird. Tatsächlich hängt der Wert von $D_2^2 - D_1^2$ und damit der Testgröße $(R-1)$ für ein $r > 0$, das sich von 1 nur wenig unterscheidet, ab vom Wert der Größe

$$\frac{1}{1-r}\left(\frac{d_1}{s_1} - \frac{d_2}{s_2}\right)^2.$$

Bei endlichem Wert der Differenz $\frac{d_1}{s_1} - \frac{d_2}{s_2}$ könnte der obige Ausdruck für sich 1 näherndes $r$ sehr groß werden; anderseits ist es gut vorstellbar, daß gerade für zwei stark korrelierte Merkmale auch die Differenz $\frac{d_1}{s_1} - \frac{d_2}{s_2}$ klein wird, so daß der Wert der Differenz $D_2^2 - D_1^2$ nicht beliebig groß werden kann.

Für mehr als zwei Merkmale werden die Rechnungen wesentlich komplizierter. Die obige Überlegung dürfte aber doch zeigen, daß hohe Korrelationen eines Merkmals mit bereits verwendeten Merkmalen allein noch nicht genügen, um von vornherein eine wesentliche Erhöhung von $D^2$ bei Einführung des neuen Merkmals erwarten zu können. Die Zunahme von $D^2$ hängt ebenso sehr ab von den Werten der Unterschiede $d_i$ und der Streuungen $s_i$ der Merkmale.

### *b) Biologischer Teil*

Der größte festgestellte Unterschied zwischen den Populationen von Bex und Vorauen findet sich bei der Flügellänge. Nun ist aber dieses Merkmal bekannt für sein starkes adaptatives Variieren, ein Umstand, der seine Eignung zum Charakterisieren von Rasseunterschieden in Frage stellt. So ist bei *D. robusta* die Flügellänge negativ korreliert mit der durchschnittlichen Jahrestemperatur der Fangplätze[14]. Bei *D. subobscura* ist sie negativ korreliert mit dem Wert der Juli-Isotherme [9,10]. Dazu kommt, daß die Flügel bei dieser Art im Winter länger sind als im Sommer, das Merkmal sich also zu jahreszeitlichen Temperaturveränderungen ebenfalls umgekehrt proportional verhält[11]. Unser Befund fügt sich in diese Erfahrungen ein: im Muster von Vorauen (das Monatsmittel im Juli 1956 betrug im benachbarten Linthal 15,5° C) sind die Flügel länger als im klimatisch milderen Bex (Julimittel im benachbarten Montreux 18,3° C).

Selbstverständlich kann ein Merkmal, das auffallend adaptativ variiert, für Rasseunterscheidungen trotzdem wertvoll sein. Denn das Variieren kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen, unter denen auch ein die Rassenbildung betreffender Faktor sein kann. So sind möglicherweise im vorliegenden Fall reversible Genfrequenzverschiebungen in Anpassung an Temperaturunterschiede zur Zeit der beiden Fänge im Spiel, sicher aber auch besser stabilisierte genotypische Unterschiede, die im Selektionsexperiment nicht ohne bedeutende Eignungseinbuße verändert werden könnten[12] und damit als eigentliche Rassenunterschiede aufzufassen sind. Schließlich mögen auch nichterbliche modifikatorische Einflüsse beispielsweise der Art, wie sie Franganillo[5] fordert, mitwirken. Beim hier diskutierten Material bleibt allerdings ungewiß, welche Anteile die drei genannten Mechanismen am festgestellten Flügellängen-Unterschied haben. Fast sicher ist, daß durch die Maßnahme, bereits die erste Nachkommengeneration von Eltern aus Wildfängen auszuwerten, ein modifikatorischer Einfluß des Milieus auf dem Weg über die Eltergeneration nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Anderseits ist bei diesem Verfahren die Gefahr selektiver Veränderung der Ausgangsrassen im Laboratorium aufs möglichste eingeschränkt.

Die übrigen von uns verwendeten Merkmale tragen, wie ein Vergleich der $D_i^2$ in Tabelle 5 zeigt, in viel geringerem Maß zum Unterscheiden der beiden Populationen bei, doch heißt das nicht, daß sie nicht auch adaptativ sein können. Wir müssen sogar annehmen, daß Umweltseinflüsse selektiv auf Forcepszähne und Geschlechtskammborsten wirken[8,9]. Es zeigt sich immer mehr, daß es methodisch falsch wäre, irgend ein quantitatives Körpermerkmal als adaptativ neutral anzusprechen. Hier wie bei der Flügellänge gilt aber, daß ein Ansprechen eines Merkmals auf Selektionseinflüsse wohl eine rassenmäßige Divergenz zu verschleieren oder überhöhen vermag, nicht aber seine Eignung zum Charakterisieren von Rasseunterschieden auszuschließen braucht.

Frau Prof. E. Goldschmidt, Jerusalem, sowie den Herren Prof. E. Hadorn, Zürich und A. Linder, Genf, danken wir für die Durchsicht des Manuskripts.

## Zusammenfassung

1. Der Unterschied zwischen zwei Populationen von *Drosophila obscura* wurde durch die Größe $D_p^2$ nach Mahalanobis als Distanz dargestellt und mit Hilfe eines verallgemeinerten $T$ nach Hotelling auf seine Sicherung geprüft. Diese Methode berücksichtigt die gegenseitige Abhängigkeit der vier Merkmale Flügellänge, Anzahl Geschlechtskammborsten, Anzahl Costalborsten und Anzahl Forcepszähne. Es zeigt sich, daß die beiden Populationen gesichert voneinander abweichen. Damit wird ein früher publiziertes Ergebnis bestätigt, doch ist der neue Befund schlüssiger, indem er auf einer umfassenderen Methode beruht.

2. Mit Hilfe eines Ausscheidungsverfahrens wird ermittelt, daß die beiden Populationen durch das einzige Merkmal der Flügellänge bereits gut unterschieden werden und die übrigen drei Merkmale im vorliegenden Fall keine gesicherte Steigerung in der Trennmöglichkeit der zwei Populationen gewähren.

3. In der Diskussion wird untersucht, welche Bedeutung der Korrelation der Merkmale für die Trennmöglichkeit bei zunehmender Zahl der Merkmale zukommt.

4. Ferner wird angenommen, daß der große Unterschied in der Flügellänge, der zwischen den beiden Populationen besteht, zum Teil auf dem adaptativen Variieren dieses Merkmals beruht, was seine Verwendbarkeit zur Rassenunterscheidung jedoch nicht ausschließt.

## Literatur

[1] Burla, H., u. A. Kälin: Biometrischer Vergleich zweier Populationen von *Drosophila obscura*. Rev. suisse Zool. **64** (10), 246—252 (1957). — [2] Fisher, R. A.: The use of multiple measurements in taxonomic problems. Ann. Eugenics, London **7**, 179—188 (1936). — [3] Fisher, R. A.: The statistical utilization of multiple measurements. Ann. Eugen. (London) **8**, 376 bis 386 (1937). — [4] Fisher, R. A., and F. Yates: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Edinburgh and London 1941. — [5] Franganillo, A. R.: Variacion estacional de caracteres en *Drosophila funebris*. Arch. Zootecnia **6**, 232—242 (1957). — [6] Hotelling, H.: The generalization of Student's ratio. Ann. Math. Stat. **2**, 360—378 (1931). [7] Mahalanobis, P. C.: On the generalized distance in statistics. Proc. nat. Inst. Sci. **2**, 49—55 (1936). — [8] Monclus, M.: Variacion geografica de los peines tarsales de los machos de *D. subobscura*. Genetica Iberica **5** (3/4), 101—114 (1953). — [9] Prevosti, A.: Variacion geografica de varios caracteres cuantitativos en poblaciones catalanas de *Drosophila subobscura*.

Genetica Iberica **6** (1/2), 33—68 (1954). — [10] Prevosti, A.: Variacion geografica de caracteres cuantitativos en poblaciones britanicas de *Drosophila subobscura*. Genetica Iberica **7** (1/2), 3—44 (1955). — [11] Prevosti, A.: Variacion estacional en las dimensiones del ala de *Drosophila subobscura*. Genetica Iberica **7** (1/2), 45—54 (1955). — [12] Prevosti, A.: Resultados de la seleccion por alas largas y por alas cortas en dos poblaciones naturales de *Drosophila subobscura*. Genetica Iberica **8**, 73—115 (1956). — [13] Rao, C. R.: Tests of significance in multivariate analysis. Biometrika **35**, 58—79 (1948). — [14] Stalker, H. D., and H. L. Carson: Morphological variation in natural populations of *Drosophila robusta*. Evolution **1**, 237—248 (4947). — [15] Wilks, S. S.: Certain generalizations in the analysis of variance. Biometrika **24**, 171—494 (1932).

Dr. A. Kälin
Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich
Abteilung für Hydrologie

Priv.-Doz. Dr. H. Burla,
Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut, Universität Zürich

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 94—115 (1959)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Mainz*

# GENETISCHE UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUGENPIGMENTSYSTEM VON *GAMMARUS PULEX* L. *(CRUST. AMPH.)*

Von

ANNEROSE ANDERS

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 29. Dezember 1958)*

## A. Einleitung

Im Verlaufe der beiden letzten Jahrzehnte haben wir durch zahlreiche Untersuchungen an Augenfarbmutanten von *Drosophila*, *Ephestia*, *Apis*, *Habrobracon* u. a. (BEADLE, ANDERSON und MAXWELL 1938; BECKER 1942; GREEN 1955; KÜHN 1955 u. a.) einen relativ guten Einblick in die genetische Bedingtheit des Augenpigmentsystems der Insekten gewonnen. Demgegenüber liegen bei anderen Arthropodengruppen so gut wie keine entsprechenden Untersuchungen vor, obwohl auch hier erbliche Augenfarbvarianten beobachtet wurden. So fand SEXTON (1912—1936) in langjährigen Untersuchungen an dem Brackwasseramphipoden *Gammarus chevreuxi* einige Augenfarbtypen mit relativ einfachem Erbgang. Weiterhin berichten KOSSWIG (1940), DE LATTIN (1939), LEGRAND (1957) und VANDEL (1940) von einer erblichen Variabilität der Pigmentbildung im Isopodenauge, die vorwiegend — aber nicht ausschließlich — bei Troglobionten auftritt.

Als nun anläßlich einer Variabilitäts- und Geschlechtsbestimmungsanalyse (ANDERS 1956, 1957) in Zuchten von ober- und unterirdisch lebenden Rassen des gemeinen Bachflohkrebses (*Gammarus pulex* L.) ebenfalls abweichende Augenfarbtypen gefunden wurden, schien es wünschenswert, diese im Hinblick auf das Augenpigmentsystem eingehender zu bearbeiten.

## B. Material und Technik

Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung dienten Flohkrebse (*Gammarus pulex pulex* L.) aus 2 Populationen der Umgebung von Mainz (Gonsenheim und Rheingoldruhe) sowie die kavernikole ssp. *subterraneus* SCHNEIDER aus dem Erzbergwerk Grund bei Bad Grund im Harz. Angaben über die Kultur der Tiere können a. a. O. eingesehen werden (ANDERS 1956).

Um unkontrollierte Ausfälle nach Möglichkeit zu vermeiden, erfolgte die Auszählung der Augenfarbtypen im allgemeinen unmittelbar nach dem Schlüpfen der Jungtiere aus dem Marsupium. Auf diese Weise erhält man fast immer einwandfreie Spaltungszahlen, die nicht — wie bei Auszählungen auf späteren Stadien — durch sekundäres Absterben der Tiere gestört sind. Selbst solche Ausfälle, die bereits vor dem Schlüpfen der Jungtiere auftreten, bleiben bei sorgfältiger Beobachtung der Muttertiere im allgemeinen nicht unbemerkt, weil diese so transparent sind, daß die Wurfgröße bereits nach der Zahl der im Ovar befindlichen, durch Carotinoide intensiv blau gefärbten Eier ziemlich genau abgeschätzt werden kann.

* D 77.

Die Untersuchung über die Verteilung der Augenpigmente wurde vor allem an ungefärbten Schnittpräparaten durchgeführt (Fixierung in Carnoy, Einbettung über Methylbenzoat-Celloidin in Paraffin). Für die speziellen Beobachtungen am einzelnen Pigmentgranulum dienten Ausstriche freipräparierter Augen, die nach kurzem Trocknen an der Luft oder über der Flamme direkt in Caedax eingeschlossen wurden. Eine Behandlung mit Fixierungsmitteln erwies sich hierbei als überflüssig und infolge der spezifischen Löslichkeit der Pigmente manchmal sogar als störend. Nähere Einzelheiten werden jeweils im Text erwähnt.

### C. Das Vorkommen von Augenfarbmutanten in Wildpopulationen

Über das Vorkommen von Augenfarbmutanten bei *Gammarus pulex* war bisher — abgesehen von einigen alten Angaben SCHNEIDERS (1885) über einen weißäugigen Typ in den Bergwerkspopulationen von Clausthal im Harz — nichts bekannt. Als nun aus bestimmten Zuchten unvorhergesehen mehrere aberrante Augenfarbtypen herausspalteten, wurden die 3 eingangs genannten Populationen in den Jahren 1951—1955 mehrmals systematisch nach Formen mit abweichender Augenfarbe durchsucht. Wie aus dem Fangergebnis (Tabelle 1) hervorgeht,

Tabelle 1. *Das Vorkommen von Augenfarbmutanten in Wildpopulationen (Fangergebnis)*

| Population | Anzahl Tiere | Augenfarbe | | | | Heterozygote |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | schwarz (+) | braun (*br/br*) | rot (*so/so*) | ± weiß (*Cl*) | |
| Bad Grund . . . . . | 650 | — | — | — | 650 | 1 *so*/+ (schwarz) |
| Rheingoldruhe . . . . . | 7350 | 7348 | — | 2 | — | 1 *so*/+ (schwarz) |
| Gonsenheim . . . . . | 28900 | 28891 | 7 | 2 | — | 1 *so*/+ (schwarz)<br>1 *w*/+ (schwarz) |
| Summe | 36900 | 36239 | 7 | 4 | 650 | |

wurden hierbei neben den normalen schwarzäugigen Flohkrebsen auch solche mit weißen, braunen und roten Augen gefunden. Auch die für die betreffenden Erbfaktoren heterozygoten Individuen aus den Wildfängen, deren Erbkonstitution dann später ermittelt wurde, sind in der Tabelle aufgeführt.

Die Häufigkeit der verschiedenen Augenfarbtypen in den einzelnen Populationen ist offenbar recht variabel. Am auffälligsten sind in dieser Beziehung die Verhältnisse in der Population Bad Grund, in der so gut wie alle Tiere mehr oder weniger weißäugig (*Cl* = *Clotted*)[1] erscheinen. Da dieser Farbtyp ausschließlich auf die subterrane Population „Bad Grund" beschränkt ist und dessen Erblichkeit in der vorliegenden Arbeit bewiesen wird, kann die Weißäugigkeit als ein Rassenmerkmal der ssp. *subterraneus* gewertet werden. Außerdem tritt in der Population Bad Grund noch ein rotäugiger Typ (*so*)[1] auf, der zwar nicht in den Freilandfängen gefunden wurde, der aber später in Zuchten herausspaltete. Dieser rotäugige Typ wurde ferner in der Population Rheingoldruhe unter 7350 und in der Population Gonsenheim unter 28900 Individuen je 2mal gefunden. Wie die genetische Analyse nun überraschenderweise ergeben hat, sind die rotäugigen Formen trotz des völlig gleichartigen Phänotyps genotypisch nicht einheitlich. Es können vielmehr 2 verschiedene mutierte Gene, $so_1$ und $so_2$, unterschieden werden, die beide in den Populationen Gonsenheim und Rheingoldruhe vorkommen. Die Identifizierung des *so*-Allels der rotäugigen Tiere aus

[1] Zur Erläuterung der Symbole vgl. S. 107 (*Cl*) und S. 104 (*so*).

der Population Bad Grund mit einem der beiden zuvor genannten war vorerst wegen Schwierigkeiten bei der Kreuzung nicht möglich. Außer diesem roten Augentyp wurden in der Population Gonsenheim noch 7 braunäugige (*br*) Individuen gefunden.

Eine zweite weißäugige Form (*w*), die vom *Cl*-Typ aus Bad Grund sowohl genetisch als auch histologisch grundsätzlich abweicht, spaltete nach Inzucht der Nachkommen von einem Freilandweibchen aus Gonsenheim heraus.

## D. Genetische und histologische Untersuchungen

### *I. Der Standardstamm* (+)

Das Auge des normalen Bachflohkrebses ist wie das vieler anderer Gammariden nierenförmig gestaltet und aus einzelnen Ommatidien, deren Zahl im Verlaufe der Individualentwicklung von 3 bis zu etwa 50 oder 60 ansteigt, zusammengesetzt. Die Farbe des Auges wirkt bei makroskopischer Betrachtung schwarz. Bei der Durchsicht vieler tausend normaläugiger Tiere aus Wildpopulationen und Zuchten ergab sich, daß diese normale Augenfarbe stets in gleichbleibender Qualität und Intensität vorliegt. Modifikative Veränderungen wurden nicht beobachtet; sie konnten nur unter bestimmten extremen Umweltbedingungen induziert werden (MICHEL und ANDERS 1954).

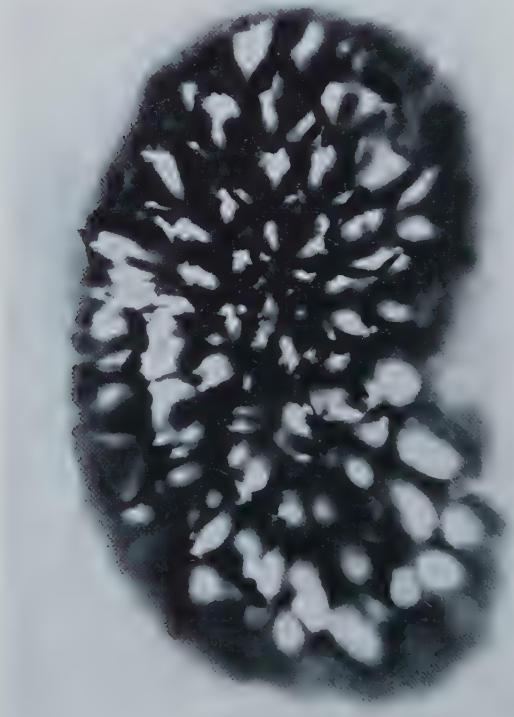


Abb. 1. Auge vom Standardstamm (+) (etwa 360:1)

Betrachtet man die Augen bei Lupenvergrößerung, so ist neben dem schwarzen noch ein weißes Pigment zu erkennen, das zwischen den einzelnen Ommatidien liegt und von diesen meist mehr oder weniger vollständig verdeckt wird (Abb. 1). Beide Pigmente liegen in granulierter Form vor.

Da das Auge des normalen Gammarus bereits mehrmals untersucht wurde (PARKER 1889, *Gammarus ornatus*; SCHATZ 1929, *Gammarus pulex*; SEXTON and CLARK 1936, *Gammarus chevreuxi*; STRAUSS 1909, verschiedene Gammariden), konnten in einer nochmaligen Bearbeitung dieser Tiere kaum neue Ergebnisse erwartet werden. Erst die abweichenden Befunde an verschiedenen Augenfarbmutanten lenkten die Aufmerksamkeit auf spezielle Fragen, deren Beantwortung sich dann auch für die Verhältnisse am normalen Auge als wichtig erwies.

**1. Die granulierten Pigmente.** *a) Histologische Verteilung.* Die histologische Verteilung des granulierten schwarzen und weißen Pigments wurde bereits von den früheren Unter-

suchern sowohl bei *Gammarus pulex* als auch bei anderen Gammariden beschrieben. Danach verteilen sich die schwarzen Pigmentgranula ausschließlich auf die Retinula- und Pigmentzellen der Ommatidien, wo sie einer lichtabhängigen physiologischen Wanderung unterliegen (PARKER 1889). Das weiße Pigment liegt dagegen außerhalb der Ommatidien und bleibt auf das Bindegewebe der interommatidialen Räume (PARKER, „akzessorische Pigmentzellen"; STRAUSS „Füllsubstanz"; SEXTON, „Interommatidialpigment") beschränkt.

*b) Morphologische Struktur der Pigmentgranula. Schwarze Granula.* Während die aus der Pigmentmasse isolierten Granula im Hellfeld eine gleichmäßig schwarzviolette Tönung zeigen, leuchten sie im Dunkelfeld intensiv rotbraun auf[1]. Besonders auffällig ist dabei, daß diese rotbraunen Granula bei identischer Farbqualität und -intensität nicht einheitlich gestaltet sind, sondern daß hier 2 deutlich voneinander verschiedene Typen auftreten (Tabelle 2). Der erste, am häufigsten vertretene Typ ist relativ groß (etwa 1 $\mu$ ⌀) und erscheint im Dunkelfeld ringförmig bzw. hohlkugelförmig. Der zweite ist viel kleiner (etwa 0,5 $\mu$ ⌀) und dabei punktförmig. Zwischen beiden Typen kommen aber gelegentlich auch Übergänge vor. Ob die ringförmigen Granula tatsächlich eine besondere Struktur besitzen oder ob das zu beobachtende Bild infolge eines durch die Größe der Granula bedingten optischen Effekts zustande kommt, läßt sich wegen der Kleinheit der Objekte im Lichtmikroskop nicht entscheiden.

Tabelle 2. *Die Größe der Augenpigmentgranula bei 10 adulten Tieren des Standardstammes.* (50 Messungen je Tier und Granulatyp bei starker Abblendung im Dunkelfeld)

| ⌀ in $\mu$ | Rotbraune Granula | | Weiße Granula (in %) |
|---|---|---|---|
| | groß (in %) | klein (in %) | |
| 0,3 | — | 10 | — |
| 0,4 | — | 36 | 8 |
| 0,5 | — | 32 | 22 |
| 0,6 | — | 16 | 50 |
| 0,7 | 2 | 6 | 16 |
| 0,8 | 14 | — | 4 |
| 0,9 | 14 | — | — |
| 1,0 | 56 | — | — |
| 1,1 | 10 | — | — |
| 1,2 | 4 | — | — |

Da nun aufgefallen war, daß das Häufigkeitsverhältnis der beiden Granulatypen zueinander keine merklichen Schwankungen zeigt, wurden umfangreiche Zählungen der Pigmentkörnchen durchgeführt, wobei sich herausstellte, daß beide Typen bei allen Tieren des Standardstammes stets in einem etwa konstanten Verhältnis von rund 80% großen zu 20% kleinen Granula vertreten sind (genauere Prüfung bei 10 Individuen; viele weitere Stichproben; vgl. Tabelle 3). Selbst bei Embryonen, die gerade mit der Ablagerung des Pigments begonnen haben, ist das gleiche Verhältnis realisiert. Entsprechendes wurde bei Wildtieren aus Dunkelkulturen, deren schwarzes Pigment erheblich vermindert ist, festgestellt. Da nun im Gegensatz hierzu bei *br*/*br*- und bestimmten *so*/+-Genotypen aus Bad Grund zwar ebenfalls konstante, aber von der Standardform in bestimmter Weise abweichende Verhältnisse gefunden wurden (s. S. 106), kann vermutet werden, daß das prozentuale Verhältnis beider Granulatypen, das die verschiedenen Farbeffekte hervorruft, erblich bedingt ist.

*Weiße Granula.* Die weißen Granula leuchten im Dunkelfeld blendend weiß auf und zeigen im Durchschnitt eine Größe von etwa 0,6 $\mu$ (Tabelle 2). Strukturtypen wurden nicht gefunden.

*Trägergranula.* Da aus Untersuchungen über die Augenpigmente der Insekten bekannt ist, daß diese wohl immer an Eiweißgranula gebunden sind (DANNEEL

[1] Der Einfachheit halber werden diese Granula in ihrer Gesamtheit weiterhin als schwarzes oder dunkles Pigment bezeichnet.

1941, Becker 1942, Hanser 1948), konnte vermutet werden, daß dies auch bei denen von *Gammarus* der Fall ist. Um dies zu prüfen, wurde der Farbstoff der ausgestrichenen Pigmentgranula nach der von Hanser (1948) beschriebenen Methode entfernt und dasselbe Präparat anschließend mit Hämatoxylin gefärbt. Auf diese Weise lassen sich die Trägergranula des dunklen Pigments mit Sicherheit nachweisen, während entsprechende, einwandfrei definierbare Strukturen beim weißen Pigment nicht nachgewiesen werden konnten.

Über die Natur des Augenpigments von *Gammarus* ist bisher wenig bekannt. Lediglich Becker (1942) macht im Rahmen seiner vergleichenden Untersuchungen über die Augenpigmente der Arthropoden einige wenige Angaben über die Augenfarbstoffe von *Carinogammarus roeseli*, einem nahen Verwandten von *Gammarus pulex*. Danach besteht das Augenpigment von *Carinogammarus* aus Ommochromen, wobei die Hauptmenge des Farbstoffs ein Ommatin ist, das von geringen Mengen eines Ommins begleitet wird. Eine einwandfreie Klärung dieser Frage war Becker jedoch wegen der Kleinheit der Augen nicht möglich. — In eigenen Versuchen wurde lediglich die Löslichkeit der Pigmente an Schnitt- und Ausstrichpräparaten geprüft. Dabei ergab sich, daß das schwarze und das weiße Pigment unter anderem in kalter absoluter Ameisensäure und in verdünnter Natronlauge leicht löslich ist, wobei das schwarze Pigment säure- und das weiße alkaliempfindlicher ist. — Während die schwarzen Pigmentgranula vor der Lösung des Farbstoffs einen Farbumschlag nach Rot zeigen, geht das weiße Pigment ohne eine Umfärbung in Lösung. — Das Pigment der schwarzen Granula zeigt das von Becker beschriebene Redoxverhalten, das beim weißen Pigment nicht beobachtet wurde. Das weiße Pigment ist im Gegensatz zum schwarzen wasserlöslich, wodurch verständlich wird, daß es nur in solchen Schnittpräparaten erhalten ist, die unter Umgehung von Wasser oder wasserhaltigen Substanzen behandelt wurden. Nach diesen Befunden scheint es sich bei dem schwarzen Pigment möglicherweise um das von Becker beschriebene Ommin zu handeln, weil die genannten Eigenschaften für diese Stoffgruppe charakteristisch sind. Dagegen muß die Frage nach der Natur des weißen Pigments noch offenbleiben. — In weiteren Versuchen wurde noch geprüft, ob die weißen und dunklen Granula zu fluoreszieren vermögen, zumal in Kopfextrakten von Insekten wiederholt fluorescierende Stoffe gefunden wurden. Es fanden sich jedoch — abgesehen von den Kristallkegeln, die auffällig blaugrün fluorescieren — keinerlei fluorescierende Körper im Auge (vgl. Reisener-Glasewald 1957).

**2. Das Carotinoid.** Bis vor kurzem galten die beschriebenen Pigmente als die einzigen, die im Auge von *Gammarus pulex* vorkommen. Da sich nun bei der Analyse der roten Augenfarbmutante (*so*; s. S. 104) herausstellte, daß deren Augenfarbe allein durch ein Carotinoid bedingt wird, konnte auch im normalen Auge mit dem Vorhandensein dieses Farbstoffes gerechnet werden. Diese Vermutung lag außerdem besonders deshalb nahe, weil bereits Huxley (1929) für *Gammarus chevreuxi* und Emmart (1936) für *Carinogammarus mucronatus* Angaben machen, die ebenfalls in diese Richtung weisen.

Entfernt man nun die granulierten Pigmente aus den Augen von frisch vom Körper getrennten Kopfsegmenten, so tritt zugleich mit dem Verschwinden des schwarzen und weißen Pigments ein roter Farbstoff in Erscheinung, der mit den üblichen Nachweismethoden (vgl. Romeis 1948 [Löslichkeit in Petroläther, Äther, Alkohol, Aceton usw., blaue Halochromie mit $H_2SO_4$)] als Carotinoid identifiziert wurde. Das Pigment bleicht bei Belichtung aus, was bei formolfixierten Tieren besonders rasch vor sich geht und direkt unter dem Mikroskop beobachtet werden kann[1]. Für die eingehendere Untersuchung der histologischen Verteilung des Carotinoids hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Tiere vor der Behandlung mit Ameisensäure kurz in Formol zu fixieren, weil hierdurch

[1] Entsprechendes berichtet Bliss (1942) von *Limulus*.

die Strukturen des Auges relativ gut erhalten bleiben. Betrachtet man ein so behandeltes Auge im Dunkelfeld, dann leuchtet das Carotinoid intensiv rot auf, wobei deutlich zu erkennen ist, daß es in fein verteilten Kügelchen von unterschiedlicher Größe (2—5 $\mu$), die sich als Fetttröpfchen erwiesen haben, gelöst ist. Besonders konzentriert erscheinen die Tröpfchen in den proximalen Teilen der Ommatidien. Distalwärts nimmt die Konzentration der Tröpfchen kontinuierlich ab. Diese Beobachtungen über das Carotinoid ließen sich bei lebenden *so/so*-Tieren, bei denen es als einziger Farbstoff im Auge vorkommt, in allen Einzelheiten bestätigen (vgl. S. 105).

Nach diesen Beobachtungen ist also im normalen schwarzen Auge von *Gammarus pulex* neben dem schwarzen Ommatidial- und weißen Interommatidialpigment stets noch ein rotes Carotinoid vorhanden. Es wurde bisher vermutlich nur deshalb übersehen, weil es im lebenden Tier von den beiden ersten Pigmenten verdeckt wird und bei der Herstellung von fixierten Präparaten mit den hierfür gebräuchlichen Reagentien gelöst bzw. zerstört wird.

### *II. Der braunäugige Stamm (br/br)*

**1. Genetische Untersuchungen.** Die Kreuzung von braunäugigen (*br/br*) mit schwarzäugigen (+/+)-Tieren ergab ausschließlich schwarzäugige Nachkommen (125 *br*/+; Tabelle 4). In der $F_2$ wurde eine sehr gute 3:1-Aufspaltung (519 schwarz:172 braun) erhalten, und die Rückkreuzung mit dem rezessiven Elter (+/*br* × *br*/*br*) brachte die erwartete 1:1-Aufspaltung (41 schwarz:36 braun). Massenzuchten der Rückkreuzung +/+ × *br*/+ ergaben ausschließlich schwarzäugige Nachkommen (349).

Die braune Augenfarbe wird also durch ein mutiertes Allel mit rezessivem Erbgang und autosomaler Lage verursacht. Pleiotropieeffekte wurden bisher nicht beobachtet.

**2. Histologische Untersuchungen.** Da die normale schwarze Augenfarbe von Gammarus vorwiegend durch das schwarze Pigment bestimmt wird, wurde zunächst vermutet, daß der aberrante braune Farbton, der in extremen Fällen bis zu einem intensiven Rotbraun variieren kann, durch eine qualitative Veränderung dieses Pigments zustandekommt. Bei einem Vergleich der Granula des +/+- und *br*/*br*-Genotyps zeigten sich jedoch keinerlei Unterschiede bezüglich Farbqualität und -intensität, sowie im Löslichkeitsverhalten. Im *br*/*br*-Auge ist allerdings weitaus weniger Pigment vorhanden als im schwarzen. Die genaue Prüfung zeigte dann, daß bei der *br*-Form der im Dunkelfeld ringförmig erscheinende große Granulatyp, dem bei der Standardform etwa 80% aller Granula angehören, bis auf einen kleinen Rest ausgefallen ist, so daß fast nur noch der kleine punktförmige Typ — also etwa $^1/_5$ aller dunklen Granula — vorhanden ist (Tabelle 3). Eine merkbare Mengenzunahme der kleinen Granulen findet dabei offenbar nicht statt; doch stehen exakte quantitative Bestimmungen noch aus.

Weitere Unterschiede zwischen der *br*- und der Standardform wurden nicht gefunden, so daß nach diesem Ergebnis die Annahme berechtigt erscheint, daß der aberrante braune Farbton durch eine Pigmentverminderung verursacht wird. Berücksichtigt man nun das gesamte Pigmentsystem, so gibt es für das Zustandekommen des braunen Farbtons immer noch 3 verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, die alle auf dieser Pigmentverminderung beruhen. Diese Möglichkeiten,

die jeweils für sich oder in Kombination realisiert sein könnten, sollen nun näher geprüft werden. Die erste wäre, daß das rote Carotinoid von dem noch vorhandenen Rest der Granula nicht mehr vollständig verdeckt wird, so daß nunmehr die Farbe des Carotinoids mit in Erscheinung träte. Wäre dies der Fall, dann müßten *br*-Augen, deren Carotinoide extrahiert sind, eine normale schwarze

Tabelle 3. *Die Verteilung der beiden rotbraunen Granulatypen bei verschiedenen Genotypen.* (Den Werten liegen je Individuum die Zählungen von 4 Ausschnitten eines Präparates zugrunde)

| Genotyp | Augenfarbe | Anzahl der Tiere | Rotbraune Granula | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | groß (in %) | klein (in %) | |
| + | schwarz | 10 | 82 | 18 | normale Kultur |
| + | braun | 5 | 80,2 | 19,8 | Embryonen |
| + | schwarzbraun | 5 | 82,7 | 17,3 | Dunkelkultur |
| $so_1/+$ | schwarzbraun | 5 | 80,5 | 19,5 | normale Kultur |
| $so_2/+$ | schwarzbraun | 6 | 83,3 | 16,7 | normale Kultur |
| *br*/+ | schwarz | 6 | 80,9 | 19,1 | normale Kultur |
| *so*/+ (Bad Grund) | schwarzbraun | 5 | 14,3 | 85,7 | normale Kultur |
| *br*/*br* | braun | 7 | 10,8 | 89,2 | normale Kultur |

Tabelle 4
*braunäugig* × *schwarzäugig*
(*br*/*br* × +/+)

| | Anzahl der Zuchten | Anzahl der Individuen | Gefunden | | Erwartet | | $m \pm$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | schwarz | braun | schwarz | braun | |
| $F_1$ | 5 | 125 | 125 | — | 125 | — | |
| $F_2$ | 18 | 691 | 519 | 172 | 518,3 | 172,7 | 11,4 |
| $F_2$ R | 4 | 77 | 41 | 36 | 38,5 | 38,5 | 4,4 |
| $F_2$ R | Massenzucht | 349 | 349 | — | 349 | — | |

Farbe zeigen. Tatsächlich besitzen aber so behandelte Augen immer noch den braunen — wenn auch etwas modifizierten — Farbton. Das Carotinoid scheint dabei die Augenfarbe des *br*/*br*-Genotyps lediglich ein wenig nach Rotbraun zu intensivieren, ohne indessen maßgeblich am Zustandekommen des braunen Farbeffekts beteiligt zu sein.

Die beiden weiteren Erklärungsmöglichkeiten bestehen darin, daß der aberrante Farbeffekt entweder durch den spezifischen Ausfall der großen Granula oder ganz allgemein durch den damit verbundenen Pigmentverlust verursacht würde. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten konnte relativ leicht entschieden werden, da +-Tiere, die bereits mehrere Generationen hindurch im Dauerdunkel gezüchtet wurden, ihre schwarze Augenfarbe behalten haben, obwohl sie wie die *br*/*br*-Genotypen eine starke Pigmentverminderung zeigen. Die histologische Untersuchung zeigte dann auch, daß die Pigmentverminderung in beiden Fällen verschiedener Art ist. Während bei den braunäugigen Tieren lediglich der große Granulatyp ausgefallen ist, kommt die Pigmentverminderung bei den dunkel gehaltenen Tieren durch eine gleichmäßige Verminderung beider Granulatypen zustande, so daß das ursprüngliche Verhältnis von etwa 80% großen zu 20% kleinen Granula erhalten bleibt (Tabelle 3).

Die vom Standard abweichende braune Augenfarbe der *br*-Zuchtrasse kommt also — wenn man von dem Intensivierungseffekt des Carotinoids absieht — durch einen spezifischen Ausfall eines von 2 gleichfarbigen Strukturelementen zustande, wodurch bei oberflächlicher Betrachtung eine qualitative Veränderung der Pigmentierung vorgetäuscht wird.

In heterozygotem Zustand hat das *br*-Allel offensichtlich keinen merkbaren Einfluß auf die Pigmentierung, denn *br*/+-Genotypen sind offensichtlich in jeder Weise genauso pigmentiert wie die reinerbige Standardform (Tabelle 3).

### *III. Die rotäugigen Stämme ($so_1/so_1$ und $so_2/so_2$)*

**1. Genetische Untersuchungen.** Da diese Tiere ausschließlich eine mehr oder weniger einheitliche leuchtend rote Augenfarbe zeigen, wurden sie mehrere Jahre hindurch für genetisch einheitlich gehalten. Erst spätere zufällige Kreuzungen erbrachten dann den zunächst überraschenden Befund, daß hier in Wirklichkeit wenigstens 2 verschiedene Genotypen mit identischer Manifestation der Augenfarbe vorliegen. Wenn nun die rotäugigen Formen im folgenden zunächst noch gemeinsam behandelt werden (sie werden deshalb einfach mit *so* symbolisiert), so erscheint dies m. E. schon dadurch hinreichend gerechtfertigt, daß sich bei einer späteren Nachuntersuchung volle Übereinstimmung hinsichtlich des Phänotyps, der geprüften Pleiotropieeffekte und des Dominanzverhaltens beider Allele ergeben hat (zum Nachweis der $so_1$- und $so_2$-Gene vgl. S. 102).

*a) Erbgang* (Tabelle 5). Aus Kreuzungen zwischen reinerbigen schwarz- und rotäugigen Krebsen gingen stets mehr oder weniger schwarz- bis braunäugige

Tabelle 5

*rotäugig* × *schwarzäugig*
($so_1/so_1$ *bzw.* $so_2/so_2$ × +/+)

| | Anzahl der Zuchten | Anzahl der Individuen | Gefunden | | Erwartet | | $m \pm$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | schwarz | rot | schwarz | rot | |
| $F_1$ | 6 | 186 | 186 | — | 186 | — | |
| $F_2$ | 33 | 1694 | 1255 | 439 | 1270,5 | 423,5 | 17,8 |
| $F_2$ R | 14 | 358 | 185 | 173 | 179 | 179 | 6,7 |
| $F_2$ R | Massenzucht | 203 | 203 | — | + | — | |

Bastarde (insgesamt 186) hervor, deren Rückkreuzung mit dem rotäugigen Elter die erwartete 1:1-Aufspaltung (185 schwarz bis braun:173 rot) ergab. Rückkreuzungen mit der Standardform brachten ausschließlich schwarzäugige Nachkommen. Die $F_2$ spaltete in einem 3:1-Verhältnis (1255 schwarz bis braun: 439 rot).

Eine Reinzucht von *so*/*so*-Tieren gelingt im allgemeinen nicht, da rotäugige ♀♀ nur in seltenen Fällen lebensfähige Nachkommen erzeugen (s. S. 103). Dennoch wurden ausnahmsweise in 4 von insgesamt 23 rotäugigen Pärchenzuchten rein rotäugige Nachkommen erhalten (insgesamt 68).

Die rote Augenfarbe wird also durch ein mutiertes Allel, $so_1$ bzw. $so_2$ (vgl. S. 102), mit nahezu rezessivem Erbgang und autosomaler Lage verursacht.

Die heterozygoten Phänotypen, deren Augenfarbe sich nicht einheitlich manifestiert, bedürfen nun noch einer besonderen Besprechung. Zwar sind alle

*so*/+-Jungtiere, wenn sie aus dem Marsupium schlüpfen, zunächst einheitlich schwarzäugig wie die +/+-Genotypen; im Verlaufe der ersten Lebenswochen treten dann jedoch vereinzelt schwarzbraun- bis dunkelbraunäugige Tiere auf, deren Augenfarbe sich in extremen Fällen weiterhin zu einem Braun aufhellt. Bei Beginn der Geschlechtsreife — in einem Alter von 8—10 Wochen — erreicht die Häufigkeit der schwarzbraunäugigen Individuen dann etwa 50%. Es handelt sich also hierbei ganz offensichtlich um eine vorwiegend altersbedingte variable Expressivität des Dominanzverhaltens der beiden *so*-Gene. Möglicherweise sind jedoch die eigentlichen Ursachen dieser Aufhellung nicht im steigenden Alter, sondern in der zunehmenden Körpergröße der Jungtiere zu suchen.

*b) Der Nachweis zweier voneinander unabhängiger so-Gene.* Da in Kreuzungen mit homo- und heterozygoten *so*-Tieren im Verlaufe mehrjähriger Arbeiten niemals Störungen der Mendel-Verhältnisse beobachtet wurden, erschien es besonders auffällig, daß unter 27 Nachkommen einer *so*/+ × *so*/+-Paarung aus zwei getrennten Inzuchtlinien zweier *so*/*so*-Freilandmännchen der Population Rheingoldruhe keine rotäugigen Individuen auftraten, obwohl dieselben Elterntiere bereits vorher in Paarungen mit Geschwistertieren rotäugige Nachkommen erzeugt hatten. Zur Deutung dieses Verhaltens mußte als erstes an ein vorzeitiges Absterben der zu erwartenden rotäugigen Jungtiere gedacht werden. Außerdem aber auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Rotäugigkeit beider Inzuchtlinien durch 2 verschiedene mutierte Gene mit identischem Phänotyp bedingt sei. Es wurden deshalb planmäßige Kreuzungen zwischen den einzelnen Inzuchtlinien durchgeführt, wobei in allen diesen Fällen die Anzahl der im Ovar befindlichen Eier und später der im Brutsack vorhandenen Jungen des zu prüfenden Wurfes abgeschätzt (s. S. 94) und mit der tatsächlichen Wurfgröße verglichen wurde. Im einzelnen wurde dabei methodisch so vorgegangen, daß *so*/+-Muttertiere (*so*/*so*-♀♀ bleiben im allgemeinen ohne Nachkommen; vgl. S. 103) zunächst mit *so*-Geschwistermännchen oder wenigstens *so*-♂♂ derselben Inzuchtlinie angepaart wurden. Erst nachdem sie eine hinreichend große Anzahl Nachkommen erzeugt hatten, wurden sie mit *so*-♂♂ der anderen Inzuchtlinie, die zuvor in entsprechender Weise mit *so*-♀♀ derselben Abstammung geprüft waren, gekreuzt. Die angesetzten Kreuzungen haben die in den Tabellen 6—8 aufgeführten Ergebnisse erbracht. Das Zahlenmaterial ist leider klein geblieben, obwohl der 1. Kreuzungsgang mit relativ großen Individuenzahlen begonnen wurde. Beim 2. Kreuzungsgang erreichten trotzdem nur noch 4 Zuchten eine für die Analyse hinreichend große Nachkommenschaft. Die in der Tabelle 6 aufgeführten heterozygoten *so*-♀♀ erzeugten nach Paarung mit ♂♂ gleicher genetischer Konstitution aus derselben Inzuchtlinie insgesamt 188 Nachkommen, die mit 48 rotäugigen:140 schwarzäugigen Jungtieren in dem erwarteten 1:3-Verhältnis aufspalteten. Mit denselben ♀♀ wurden in einer 2. Paarung mit rotäugigen ♂♂ der anderen Inzuchtlinie, die bereits vorher mit heterozygoten

Tabelle 6

$so_1/+$; $so_2^+/.$ × $so_1/+$; $so_2^+/.$

| ♀ × ♂ | Anzahl | Würfe | Rot | Schwarz | |
|---|---|---|---|---|---|
| 133 × I | 59 | 7 | 18 | 41 | |
| 166 × II | 91 | 9 | 22 | 69 | |
| 180 × III | 24 | 3 | 5 | 19 | |
| 220 × IV | 14 | 1 | 3 | 11 | |
| Summe | 188 | 20 | 48 | 140 | $m = \pm 5{,}9$ |

Geschwisterweibchen 40 rot- und 47 schwarzäugige Nachkommen erzeugt hatten (Tabelle 8), 94 ausschließlich schwarzäugige Nachkommen erzielt (Tabelle 7), obwohl diese Kombination bei Annahme eines einzigen *so*-Allels eine 1:1-Aufspaltung erwarten ließ. Bei Annahme eines vollständigen Ausfalls rotäugiger Individuen hätten nun 94 Eier oder Embryonen aus irgendeinem Grunde abgestorben sein müssen. Abgesehen davon, daß so hohe Ausfälle niemals hätten verborgen bleiben können, wurden auch durch direkte Beobachtung der Eier und Embryonen keine nennenswerten Verluste festgestellt. Auch die Anzahl von 94 Nachkommen in 9 Würfen entspricht ganz der normalen Wurfgröße dieser Tiere, so daß auch hier der Verdacht einer vorzeitigen Sterblichkeit der anfänglich zu erwartenden rotäugigen Farbklasse ausgeschlossen ist. Es bleibt deshalb für dieses zunächst unerwartete Kreuzungsergebnis nur die eine Erklärungsmöglichkeit, daß die *so*-Faktoren der beiden geprüften Inzuchtlinien nicht identisch sind, sondern daß es sich dabei in Wirklichkeit um 2 voneinander unabhängige, nicht-allele Gene, $so_1$ und $so_2$, mit identischem phänotypischem Effekt handelt. Über die Verteilung der beiden *so*-Faktoren auf die Wildpopulationen vgl. S. 95.

Tabelle 7

$so_1/+ ; so_2^+/. \times so_1^+/. ; so_2/so_2$

| ♀ × ♂ | Anzahl | Würfe | Rot | Schwarz |
|---|---|---|---|---|
| 133 × V | 16 | 2 | — | 16 |
| 166 × VI | 17 | 2 | — | 17 |
| 180 × VII | 34 | 3 | — | 34 |
| 220 × VIII | 27 | 2 | — | 27 |
| Summe | 94 | 9 | — | 94 |

Tabelle 8

$so_1^+/. ; so_2/+ \times so_1^+/. ; so_2/so_2$

| ♀ × ♂ | Anzahl | Würfe | Rot | Schwarz |
|---|---|---|---|---|
| 219 × V | 27 | 2 | 13 | 14 |
| 221 × VI | 13 | 1 | 7 | 6 |
| 217 × VII | 22 | 2 | 9 | 13 |
| 215 × VIII | 25 | 2 | 11 | 14 |
| Summe | 87 | 7 | 40 | 47 $m = \pm 4{,}7$ |

*c) Die Letalwirkung der so-Gene.* Schon bei dem 1. Versuch einer Reinzucht der *so*-Stämme stellte es sich heraus, daß rotäugige ♀♀ im allgemeinen keine oder nur sehr wenige Nachkommen erzeugen, obwohl die *so*-Gene in den anderen Kombinationen keinerlei erkennbaren Einfluß auf die Vitalität und Viabilität der Flohkrebse ausüben. Um diese Erscheinung näher zu prüfen, wurden umfangreiche Zuchten mit homozygoten $so_1$- und $so_2$-Muttertieren, die mit ♂♂ aller verfügbarer Erbkonstitutionen gekreuzt wurden, angesetzt. Da sich die Anwesenheit von $so_1$ oder $so_2$, die Populationszugehörigkeit sowie der Genotyp des Vatertieres und der Jungtiere für diese Untersuchungen später als belanglos erwiesen, genügt hier eine ganz summarische Darstellung der Ergebnisse (Tabelle 9): Alle 79 geprüften ♀♀ kopulierten normal und legten in der Beobachtungszeit durchschnittlich 5mal die normale Anzahl Eier (je nach Größe des ♀ 6 bis 20 Stück) in das Marsupium ab. Diese Eier entwickelten sich meistens nicht oder doch nur ausnahmsweise zu lebensfähigen Jungtieren. Daher blieben 41 ♀♀ (51,9%) ohne jegliche Nachkommenschaft, 23 ♀♀ (29,1%) erzeugten durchschnittlich nur etwa 4 und weitere 10 ♀♀ (12,7%) durchschnittlich 12 Jungtiere. Lediglich 5 Muttertiere (6,3%) erbrachten eine etwa normale Anzahl Nachkommen, unter denen die rotäugigen $F_1$-♀♀ wiederum fast ausnahmslos ohne Nachkommen blieben.

Um zu prüfen, wann die Eizellen bzw. Embryonen absterben, wurden diese bei zahlreichen rotäugigen Weibchen zu verschiedenen Zeitpunkten dem Brutsack entnommen und in Total- bzw. Quetschpräparaten untersucht. Es ergab sich dabei, daß die Eizellen dieser Weibchen stets befruchtet sind und daß die ersten Entwicklungsstadien der Embryonen offenbar ganz normal durchlaufen werden. Erst später, zu einem Zeitpunkt, wenn bereits die Extremitäten deutlich erkennbar sind, wird dann die Entwicklung je nach dem Muttertier auf einem früheren oder späteren Stadium unterbrochen. Dies erfolgt gewöhnlich bei allen Embryonen eines Eigeleges gleichzeitig; daneben gibt es aber hin und wieder auch Fälle, in denen die Keime auf sehr verschiedenen Entwicklungsstadien, die von der Besamung bis fast zum Zeitpunkt des Schlüpfens aus dem Ei reichen, zugrunde gehen. Hierbei können dann gelegentlich einzelne Embryonen die Entwicklungskrise überwinden, schlüpfen und sich normal weiterentwickeln. Mißgestaltete Embryonen und Jungtiere wurden niemals beobachtet.

Tabelle 9. *Nachkommenschaften von 79 so/so—♀♀*

| Muttertiere | | Anzahl der Nachkommen | Durchschnittliche Anzahl der Eiablagen je Muttertier |
|---|---|---|---|
| Anzahl | % | | |
| 41 | 51,9 | keine | 4 |
| 23 | 29,1 | 1—10 | 5 |
| 10 | 12,7 | 11—20 | 6 |
| 2 | | 21—30 | 6 |
| 1 | 6,3 | 48 | 4 |
| 1 | | 54 | 5 |
| 1 | | 119 | 10 |

Nach diesen Beobachtungen haben die von rotäugigen Muttertieren stammenden Embryonen offenbar eine Entwicklungskrise zu überwinden, die nach dem Ergebnis der bisherigen Untersuchungen bald nach der Besamung beginnt und fast bis zum Schlüpfen aus der Eihülle andauert. In deren Verlauf geht weitaus die Mehrzahl der Nachkommen zugrunde. Nur einzelne „Durchbrenner" überwinden die Krise, entwickeln sich dann ganz normal weiter und zeigen später — gleichgültig, ob sie schwarz- oder rotäugig sind — keinerlei Vitalitätsstörungen.

Vom terminologischen Standpunkt aus erhebt sich nun noch die Frage, ob das frühe Absterben der Embryonen als Sterilität der Weibchen oder als Letalität der Jungtiere aufzufassen ist (vgl. hierzu die entsprechenden Definitionen bei HADORN, 1955). Diese Frage ist indessen ziemlich leicht zu entscheiden, wenn allein die Wirkung der *so*-Faktoren ins Auge gefaßt wird. Es zeigt sich nämlich, daß die Fertilität der *so/so*-♀♀ keinesfalls durch das mutierte Gen beeinflußt wird, denn alle besitzen die normale Anzahl befruchteter Marsupialeier. Erst später, wenn die Embryonalentwicklung begonnen hat, manifestiert sich die noch vom Muttertier stammende *so/so*-Wirkung im Keim und bringt diesen — unabhängig von dessen eigenem Genotyp — zum Absterben. Demnach können die beiden mutierten Gene $so_1$ und $so_2$ als bedingte Letalfaktoren mit prädeterminativer Wirkung bezeichnet werden.

**2. Histologische Untersuchungen.** Bei den $so_1/so_1$- und $so_2/so_2$-Krebsen ist das schwarze und das weiße Pigment restlos ausgefallen[1], so daß die Augen dieser Tiere ausschließlich das Carotinoid enthalten, das dann naturgemäß die rote Augenfarbe bestimmt (Abb. 2). Die histologische Verteilung dieses Pigments

[1] Aus diesem Grunde wurden die rotäugigen Mutanten mit „*so*" — *s*ine *o*mmochrom — symbolisiert.

wurde bereits bei der Standardform, bei der es lediglich durch die weißen und schwarzen Pigmentmassen verdeckt ist, dargestellt, so daß sich eine nochmalige Besprechung erübrigt.

Die Beobachtung, daß die beiden *so so*-Genotypen kein granuliertes Pigment besitzen, wirft nun die Frage auf, ob auch die Trägergranula ausgefallen sind. Zunächst hatte es den Anschein, als ob dies zuträfe (Michel und Anders 1954). Es schienen also beim *so-Gammarus* ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie bei der *wa*-Mutante von *Ephestia* bzw. der *w*-Mutante von *Drosophila* (Hanser 1948; Kühn 1955). Spätere Untersuchungen mit einer verfeinerten Technik und einer besseren Optik zeigten aber, daß die rotäugigen Tiere mit großer Wahrscheinlichkeit doch Trägergranula besitzen. Diese können allerdings nicht ohne weiteres mit Sicherheit als Trägergranula identifiziert werden, weil ähnliche Strukturen (Mitochondrien, Mikrosomen usw.) auch in anderen Geweben vorkommen. Da diese Granula jedoch gerade in den Pigment- und Retinulazellen dicht gepackt auftreten, ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei wirklich um Trägergranula handelt. Diese Annahme wird darüber hinaus besonders dadurch gestützt, daß auch im normalen Auge nach Pigmentextraktion dieselben Strukturen, die hier nachweislich die Trägergranula sind, sichtbar werden. Die *so*-Gene bewirken also offenbar allein den Ausfall der Farbstoffkomponente der Pigmentgranula, während die Eiweißkomponente in Form der Trägergranula erhalten bleibt.

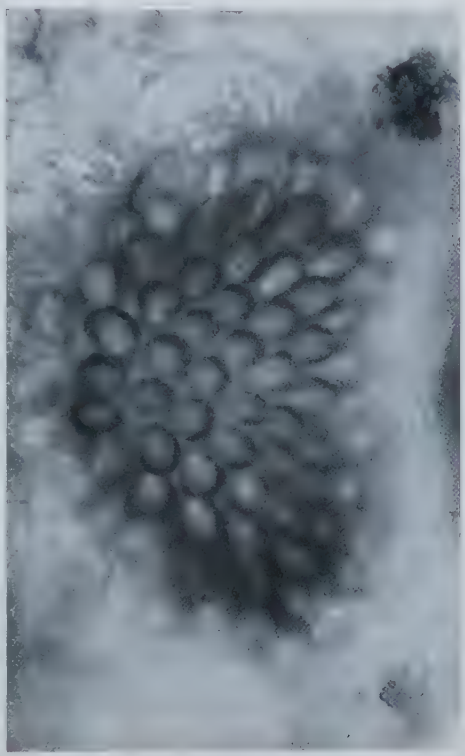


Abb. 2. Auge vom rotäugigen Stamm ($so_1$) (etwa 360:1)

Es seien hier noch Untersuchungen an heterozygoten *so*/+-Krebsen angeschlossen. Da die Augenfarbe dieser Tiere in vielen Fällen von derjenigen der Standardform abweicht (s. S. 102), wurden in den histologischen Untersuchungen die Pigmentgranula beider Genotypen miteinander verglichen (um eventuell bestehende Unterschiede zu finden). Dabei ergab sich, daß die heterozygoten Krebse prinzipiell dieselben Pigmente wie die Standardform besitzen. Allerdings ist das dunkle Pigment nur bei den schwarzäugigen Heterozygoten in der normalen Konzentration vorhanden, während es bei braunäugigen Individuen wohl immer etwas vermindert ist. Eingehendere Untersuchungen über die Pigmentverminderung zeigten dann noch einige weitere Besonderheiten. Bei Tieren aus den Populationen Gonsenheim und Rheingoldruhe sind die beiden Granulatypen in gleicher Weise vermindert, so daß die normale Verhältniszahl

von etwa 80% große zu 20% kleine Granula erhaltenbleibt (Tabelle 3). Dagegen betrifft die Pigmentverminderung bei den *so*/+-Krebsen aus der Population Bad Grund die beiden Granulatypen in ungleicher Weise. Hier beträgt das Verhältnis der beiden Typen 14,3% große zu 85,7% kleine Granula. Wir finden also hier etwa dasselbe Verhältnis vor, das auch bei *br*/*br*-Tieren realisiert ist. Dennoch lassen sich diese Werte nicht unmittelbar miteinander vergleichen, weil im Falle der *br*-Genotypen — wie aus der augenscheinlichen Gesamtmenge der Granula hervorgeht — offenbar allein der große ringförmige Typ ausgefallen ist, während bei den subterranen *so*/+-Tieren die großen ringförmigen Elemente ganz oder wenigstens teilweise durch punktförmige ersetzt werden, ohne daß die Gesamtmenge der Granula so stark wie bei *br*/*br*-Individuen reduziert ist.

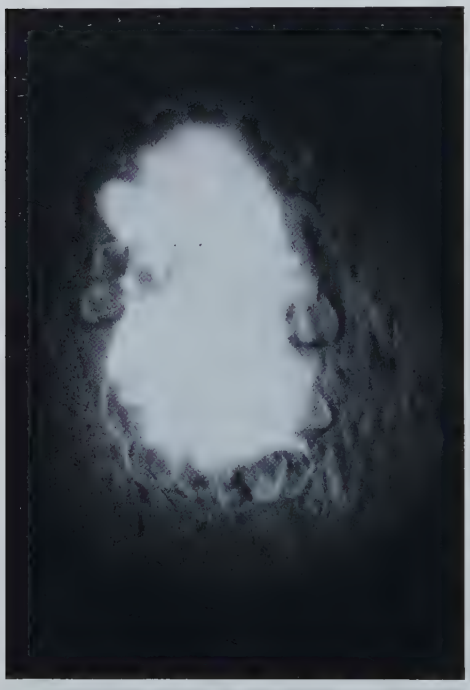


Abb. 3. Auge der weißäugigen Mutante (*w*) (etwa 360:1)

Dieser histologische Befund gibt darüber hinaus eine Erklärung für die eigenartige Tatsache, daß die heterozygoten *so*/+- Tiere aus Bad Grund oft eine fast rotbraune Augenfarbe zeigen, wie sie in den anderen Populationen niemals beobachtet wurde.

*IV. Die weißäugige Mutante (w/w)*

**1. Genetische Untersuchungen.** Bei der Inzucht eines schwarzäugigen Stammes, der keinerlei Anzeichen einer Augenanomalie zeigte, erbrachte eine $F_3$-Paarung 18 normal schwarzäugige und 4 weißäugige Individuen. Drei dieser weißäugigen (*w*/*w*) Krebse gingen bereits im Alter von etwa 3—4 und der vierte im Alter von 8 Wochen zugrunde. Die Zucht gelang daher nicht.

Das Spaltungsergebnis legt trotz des geringen Zahlenmaterials die Vermutung nahe, daß die Weißäugigkeit dieser Tiere durch ein rezessives Allel (*w*) kontrolliert wird, das im homozygoten Zustand eine letale oder wenigstens subletale Wirkung entfaltet.

**2. Histologische Untersuchungen.** Diese Mutante besitzt im Auge lediglich das weiße Interommatidialpigment, so daß das ganze Auge weiß erscheint (Abb. 3). Auch in Dunkelfelduntersuchungen konnten weder dunkle Pigmentgranula noch carotinoidhaltige Fetttröpfchen gefunden werden. Die Trägergranula sind wahrscheinlich vorhanden. Da auch die Menge des Interommatidialpigments — wenigstens in den distalen Teilen des Auges — auffallend reduziert ist, hat es bei oberflächlicher Betrachtung den Anschein, als ob die Kristallkegel bei dieser Mutante frei auf dem Auge lägen.

### *V. Der weißäugige Stamm „Clotted" (Cl)*

Schon beim Fang dieser Tiere, die ausschließlich der ssp. *subterraneus* angehören (s. S. 95), zeigte sich eine außerordentlich starke Variabilität in der Verteilung des weißen Pigments. Da nun diese Varianten für die genetische Analyse nach histologischen Gesichtspunkten eingeteilt werden mußten, seien hier die histologischen Untersuchungen vorangestellt.

**1. Histologische Untersuchungen.** Während die Mutanten *br*, *so* und *w* durch den Ausfall einer bestimmten Komponente des Augenpigmentsystems gekennzeichnet sind, liegt bei der *Cl*-Form lediglich eine aberrante Verteilung des weißen Interommatidialpigments vor. Dieses Pigment, das normalerweise auf das interommatidiale Bindegewebe beschränkt ist und deshalb von den Ommatidien mehr oder weniger vollständig verdeckt wird, wuchert bei *Cl*-Tieren distalwärts hervor und schiebt sich jeweils zwischen Cornea und Kristallkegel. Dies kann in extremen Fällen soweit gehen, daß fast alle Ommatidien vom weißen Pigment überwuchert werden, wodurch das Auge dann einheitlich weiß erscheint. Allerdings zeigen sich in solchen extrem weißen Augen bei näherer Betrachtung immer noch einige unregelmäßige Aussparungen, die jeweils kleinere Areale der darunterliegenden Ommatidien freilassen (Abb. 4). Da bereits Sexton and Clark (1936) eine ähnliche Erscheinung am Auge von *Gammarus chevreuxi* beschrieben haben und diese in Anlehnung an die äußere Ähnlichkeit mit geronnener Milch mit der Bezeichnung „*Clotted*" (*Cl*) = „geronnen" belegen, wurde das Symbol *Cl* auch für *Gammarus pulex* übernommen.

Die Augenpigmente selbst zeigen bei *Cl*-Tieren keinerlei Veränderungen gegenüber dem Standardstamm. Auch der gesamte morphologische und histologische Aufbau des Auges zeigt — abgesehen von der für diesen Stamm charakteristischen Wucherung des Interommatidialpigments — keinerlei Abnormitäten.

Dieser Befund weicht allerdings etwas von den Angaben Schneiders (1885), die in mancher Hinsicht später durch Mühlmann (1938) bestätigt worden sind, ab. Nach diesen beiden Autoren soll sich der normalerweise eng geschlossene Ommatidienverband bei der ssp. *subterraneus* im Verlaufe einer Degeneration aufgelockert haben, wodurch die weißen interommatidialen Räume vorherrschend und für die Augenfarbe ausschlaggebend geworden sind.

**2. Genetische Untersuchungen.** Die genetische Bearbeitung dieser weißäugigen Tiere bereitete anfänglich große Schwierigkeiten, weil das Merkmal in ganz verschiedenen Intensitätsgraden auftritt. Deshalb wurden die Phänotypen zunächst in die Intensitätsklassen $Cl_1$, $Cl_2$, $Cl_3$, $Cl_4$ und $Cl_5$ eingeteilt, wobei $Cl_1$ den stärksten und $Cl_5$ den schwächsten Grad der Weißäugigkeit darstellt[1]. Da natürliche Cäsuren, die diese Klasseneinteilung hätten erleichtern können, nicht beobachtet wurden, sind die Grenzen zwischen den einzelnen Klassen völlig willkürlich festgelegt worden. Im einzelnen wurde dabei nach den bei Lupenvergrößerung erhaltenen Bildern folgendermaßen unterschieden:

$Cl_1$. Das Auge ist fast vollständig vom Interommatidialpigment überzogen. Viele Ommatidien sind vollständig verdeckt. Tiere dieser Klasse sind sehr selten. Im natürlichen Biotop wurden sie nicht gefangen; sie traten erst als seltene Ausnahmen nach Kreuzungen im Laboratorium auf (Abb. 4).

[1] Die Bezeichnungen $Cl_1$ bis $Cl_5$ stellen also keine Gensymbole dar.

$Cl_2$. Der Überzug aus weißem Pigment erreicht bei dieser Klasse nicht ganz so starke Ausmaße wie bei $Cl_1$. Dennoch ist auch hier ein großer Teil der Ommatidien vom weißen Pigment verdeckt.

$Cl_3$. Die einzelnen Ommatidien sind hier nicht vollständig von den weißen Pigmentmassen verdeckt, sondern lediglich mehr oder weniger stark umwuchert.

Abb. 4. Auge vom weißäugigen Stamm ($Cl_3$) (etwa 360:1)

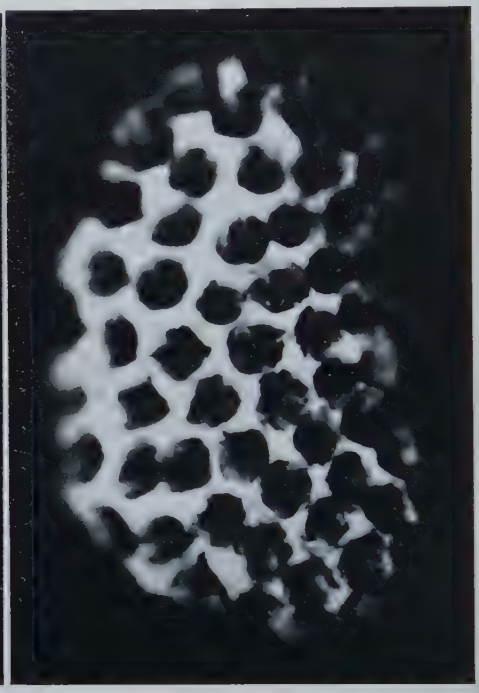


Abb. 5. Auge vom weißäugigen Stamm ($Cl_4$) (etwa 360:1)

$Cl_4$. Hier ist die Wucherung nicht so stark wie bei $Cl_3$ (Abb. 5).

$Cl_5$. Bei diesen Tieren kann nur eine relativ unbedeutende Wucherung des weißen Pigments beobachtet werden, so daß sie sich hinsichtlich der Augenfarbe weitgehend der oberirdischen Wildform annähern. $Cl_5$-Formen wurden im Freiland (Höhlenbiotop) nicht beobachtet. Sie traten erst nach Kreuzungen im Laboratorium auf.

Das Merkmal ist also, wie die Beschreibung der *Cl*-Klassen zeigt, außerordentlich variabel. Dies kommt übrigens nicht zuletzt noch darin zum Ausdruck, daß oftmals Tiere gefunden werden, deren rechtes und linkes Auge zwei ganz verschiedenen Klassen zugeordnet werden muß. Außerdem kommt es auch häufig vor, daß die Tiere im Verlaufe der Individualentwicklung verschiedene *Cl*-Grade durchlaufen, wobei die Ausbreitung des weißen Pigments mit zunehmendem Alter zunimmt. Möglicherweise ist diese Erscheinung jedoch weniger auf das Lebensalter als vielmehr auf die damit verbundene Größenzunahme der Individuen zurückzuführen. Die Variabilität ist also in einem beträchtlichen Ausmaß modikativer Natur.

*a) Kreuzungsergebnisse. Paarungen von Tieren gleicher Cl-Grade* (Tabelle 10). $Cl_2 \times Cl_2$. Von den erhaltenen 187 Nachkommen erwiesen sich 169 (90,4%) als $Cl_2$. Die restlichen 18 Tiere (9,6%) verteilen sich auf die $Cl_3$- und $Cl_4$-Klasse. In dieser Kreuzung ist also weitaus die Mehrzahl aller Nachkommen genauso weißäugig wie die Elterngeneration.

Tabelle 10. *Paarungen von Tieren gleicher Cl-Grade*

| Kombination der *Cl*-Klassen | Anzahl der Nachkommen | $Cl_2$ | | $Cl_3$ | | $Cl_4$ | | $Cl_5$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % |
| $Cl_2 \times Cl_2$ | 187 | 169 | 90,4 | 14 | 7,5 | 4 | 2,1 | — | — |
| $Cl_3 \times Cl_3$ | 134 | 25 | 18,7 | 85 | 63,4 | 24 | 17,9 | — | — |
| $Cl_4 \times Cl_4$ | 167 | — | — | 23 | 13,8 | 140 | 83,8 | 4 | 2,4 |

$Cl_3 \times Cl_3$. Von 134 Nachkommen waren nur 85 (63,4%) $Cl_3$ wie die Elterntiere. Von den übrigen Tieren verteilen sich 25 (18,7%) auf die $Cl_2$- und 24 (17,9%) auf die $Cl_4$-Klasse.

$Cl_4 \times Cl_4$. Von 167 erhaltenen Nachkommen waren in dieser Kombination 140 (83,8%) $Cl_4$ wie die Elterntiere. 23 $F_1$-Individuen waren $Cl_3$, und 4 Ausnahmetiere wurden als fast schwarz ($Cl_5$) registriert.

*Paarungen von Tieren verschiedener Cl-Grade* (Tabelle 11) $Cl_2 \times Cl_3$[1]. Die Nachkommen dieser Kreuzungsgruppe verteilen sich auf alle *Cl*-Klassen, wobei allerdings der größte Teil der Jungtiere den elterlichen Klassen angehört (33,8% $Cl_2$, 50,3% $Cl_3$).

Tabelle 11. *Paarungen von Tieren verschiedener Cl-Grade*

| Kombination der *Cl*-Klassen | Anzahl der Nachkommen | $Cl_1$ | | $Cl_2$ | | $Cl_3$ | | $Cl_4$ | | $Cl_5$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % |
| $Cl_2 \times Cl_3$ | 207 | 2 | 1,0 | 70 | 33,8 | 104 | 50,2 | 28 | 13,5 | 3 | 1,5 |
| $Cl_2 \times Cl_4$ | 53 | — | — | 2 | 3,8 | 22 | 41,5 | 26 | 49,1 | 3 | 5,6 |
| $Cl_3 \times Cl_4$ | 92 | — | — | 2 | 2,2 | 48 | 52,2 | 37 | 40,2 | 5 | 5,4 |

$Cl_2 \times Cl_4$. Die Mehrzahl der Nachkommen dieser Kombination gehört den mittleren und nicht den extremen elterlichen *Cl*-Klassen an (41,5% $Cl_3$ und 49,1% $Cl_4$).

$Cl_3 \times Cl_4$. Das Ergebnis dieser Kreuzungskombination stimmt im großen und ganzen mit dem der vorhergehenden überein (52,2% $Cl_3$ und 40,2% $Cl_4$).

*Weißäugig ($Cl_2$ und $Cl_4$) × schwarzäugig ($Cl^+$)* (Tabelle 12). $Cl_2 \times Cl^+$. Da die *Cl*-Tiere ausschließlich auf die Population Bad Grund beschränkt sind, in der keine $Cl^+$-Individuen auftreten, müssen in dieser Kombination Höhlenkrebse mit oberirdisch lebenden Tieren gekreuzt werden. Solche Paarungen bringen nur in seltenen Fällen Nachkommen hervor, so daß das Zahlenmaterial relativ klein geblieben ist.

Die Nachkommen dieser Kreuzungskombination gruppieren sich mit 29,4% $Cl_3$ und 70,6% $Cl_4$ eindeutig in den mittleren Klassen.

[1] Da die reziproken Kreuzungen hier wie auch in den folgenden Kombinationen die gleichen Ergebnisse brachten, werden sie jeweils gemeinsam behandelt.

Tabelle 12. *Weißäugig ($Cl_2$ und $Cl_4$) × schwarzäugig ($Cl^+$)*

| Kombination der *Cl*-Klassen | Anzahl der Nachkommen | $Cl_3$ | | $Cl_4$ | | $Cl_5$ | | $Cl^+$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % |
| $Cl_2 \times Cl^+$ | 34 | 10 | 29,4 | 24 | 70,6 | — | — | — | — |
| $Cl_4 \times Cl^+$ | | | | | | | | | |
| $F_1$ | 14 | 1 | 7,1 | 6 | 42,9 | 6 | 42,9 | 1 | 7,1 |
| $F_2$ | 176 | 9 | 5,1 | 74 | 42,2 | 84 | 47,4 | 9 | 5,1 |

$Cl_4 \times Cl^+$. Diese Paarung erbrachte Nachkommen, die vorwiegend bei $Cl_4$ und $Cl_5$ lagen. Aus dieser nicht sehr zahlreichen $F_1$ konnte eine $F_2$ mit 176 Individuen gezüchtet werden, die sich wie folgt verteilt: 5,1% $Cl_1$, 42,2% $Cl_4$, 47,4% $Cl_5$ und 5,1% $Cl^+$. Die in der $F_2$ erhaltenen Werte entsprechen fast vollständig den $F_1$-Werten.

Aus diesen Kreuzungsergebnissen geht zunächst hervor, daß die Ausprägung des *Cl*-Merkmals erblich bedingt ist. Im großen und ganzen gilt die Regel, daß extrem weißäugige Elterntiere stets wieder weißäugige Nachkommen und Elterntiere mit schwacher *Cl*-Ausprägung vorwiegend wiederum Nachkommen desselben Typs ergeben. Während diese beiden Kreuzungsgruppen jeweils mehr oder weniger einheitliche Jungtiere hervorbringen, ergeben Paarungen mittlerer *Cl*-Grade Nachkommen, die sich über die ganze Skala aller Intensitätstypen verteilen.

Im einzelnen könnten diese Kreuzungsergebnisse so gedeutet werden, daß das Merkmal *Cl* durch ein dominantes Allel bedingt wird, wobei dann die kontinuierliche Folge der Intensitätstypen teils durch modifizierende Außenfaktoren, vorwiegend aber durch Modifikationsgene, die die Wirkung des Grundgens intensivieren bzw. abschwächen, erklärt werden könnte. Gegen eine solche Interpretation spricht allerdings das Ergebnis der $F_2$ der $Cl_4 \times Cl^+$-Kreuzung (Tabelle 12), bei der — monofaktorielle Bedingtheit vorausgesetzt — eine 1:3-Aufspaltung in die Standard- und in die *Cl*-Form erwartet werden müßte. Tatsächlich wird hier aber eine kontinuierliche Folge von $Cl_3$ bis zu $Cl^+$-Typen beobachtet, bei welcher die Extremtypen viel seltener sind als die intermediären. Dies zwingt dazu, einen komplizierteren Erbgang anzunehmen, wobei die wahrscheinlichste Interpretation diejenige des Vorhandenseins mehrerer additiv wirkender Gene ist.

Über die Anzahl der Gene, die das *Cl*-Merkmal bedingen, läßt sich nichts Sicheres aussagen. Die beobachtete Aufspaltung von 167 *Cl* (verschiedener Grade) : 9 $Cl^+$-Tieren deutet jedoch mit einiger Wahrscheinlichkeit auf eine digene Bedingtheit des Clotted-Effektes hin, die im Idealfall eine 165:11-Spaltung hätte ergeben müssen.

Unter der Annahme eines solchen Erbganges sind auch die Ergebnisse der Paarungen von $Cl_2 \times Cl_2$- und $Cl_4 \times Cl_4$-Tieren, deren Nachkommen mehr oder weniger vollständig dem Elterntyp angehören, durchaus verständlich, da hier weitgehend homozygote Elterntiere verwendet wurden. Dagegen müßte bei Paarungen mittlerer *Cl*-Grade, die zu einem wesentlich höheren Prozentsatz Heterozygote einschließen, auch mit einer weitaus größeren Variabilität gerechnet werden. Wie die Kreuzungsergebnisse zeigen, entspricht dies auch den Tatsachen. Die Vorstellung eines digen polymer bedingten Erbganges mit Dominanz der *Cl*-Allele stimmt also recht gut mit den Kreuzungsergebnissen überein.

## E. Besprechung der Ergebnisse

Die folgenden Erörterungen sollen sich nun vor allen Dingen mit dem Pigmentsystem im Auge von *Gammarus pulex* befassen, wobei anschließend ein Vergleich dieses Systems mit demjenigen anderer Arthropoden versucht werden soll.

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, besteht das Augenpigmentsystem von *Gammarus pulex* wenigstens aus 3 verschiedenen stofflichen Komponenten: dem dunklen Ommatidial-, dem weißen Interommatidialpigment und einem roten Carotinoid.

Die weiteren genetischen und histologischen Untersuchungen an den Mutanten $so_1$ und $so_2$, *br*, *Cl* und *w*, deren Ergebnisse noch einmal in einer tabellarischen Übersicht zusammengestellt werden (Tabelle 13), führten zu einer etwas detaillierteren Kenntnis der Genetik dieses Augenpigmentsystems, so daß wir heute

Tabelle 13. *Die analysierten Augenfarbtypen von Gammarus pulex*

| Genotyp | Augenfarbe | Erbgang | Pigmentgranula | | | Carotinoid |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | rotbraun | | weiß | |
| | | | groß | klein | | |
| +/+ | schwarz | | + | + | + | + |
| *w/w* | weiß | rezessiv | — | — | (+) | — |
| *so/so* | rot | semidominant; bedingter Letalfaktor mit maternalem Effekt | — | — | — | + |
| *br/br* | braun | rezessiv | — | + | + | + |
| *Cl* | weiß | polymer-additiv-dominant | + | + | + | + |

von der vermutlich relativ großen Anzahl von Genen, die die normale Pigmentausbildung kontrollieren, wenigstens 5 kennen.

Von diesen 5 Genen hat $w^+$ offensichtlich für die normale Pigmentbildung die größte Bedeutung, weil es — wie aus der Wirkungsweise seines rezessiven Allels hervorgeht — alle 3 Farbkomponenten beeinflußt. Wird sein normales Wirken durch die Mutation zu *w* abgewandelt, so können das dunkle Ommatidialpigment und das rote Carotinoid, 2 ihrer chemischen Natur nach ganz verschiedene Pigmente gar nicht gebildet bzw. abgelagert werden, und die Menge des weißen Pigments wird zumindest etwas reduziert. Darüber hinaus hat $w^+$ aber offensichtlich noch andere lebenswichtige Funktionen zu erfüllen, durch deren Ausfall das mutierte Allel im homozygoten Zustand letal oder wenigstens subletal zu wirken scheint.

Kaum weniger tiefgreifend ist die Wirkung der beiden Gene $so_1{}^+$ und $so_2{}^+$, denn ihre mutierten $so_1$- bzw. $so_2$-Allele bewirken jeweils einen vollständigen Ausfall des weißen und schwarzen Pigments und darüber hinaus einen bedingten Letaleffekt.

Das $br^+$-Gen kontrolliert demgegenüber offenbar nur die Ausbildung eines bestimmten (des größeren) von 2 Granulatypen, deren Pigment identisch ist. $br^+$ ist dabei für den grundlegenden Vorgang der Pigmentbildung selbst nicht erforderlich, da auch *br/br*-Individuen diesen Farbstoff zu bilden vermögen.

Durch den Ausfall des großen Granulatyps, (rund $^4/_5$ aller dunklen Granula) wird allerdings eine ganz erhebliche Pigmentverminderung verursacht. Auf das übrige Pigmentsystem hat $br^+$ offenbar keinen Einfluß.

Während die bisher besprochenen Gene in irgendeiner Weise in die Ausbildung des normalen Pigmentsystems selbst eingreifen, beschränkt sich die Wirkung der $Cl^+$-Gene darauf, die Ablagerung des Pigments auf das interommatidiale Gewebe zu begrenzen. Demzufolge stellen sie vor allem Verteilungsfaktoren dar, die, ohne daß sie in das Pigmentsystem eingreifen, trotzdem das Auge in seinem Aussehen und auch in seiner Funktion erheblich beeinflussen. Daneben kontrollieren sie allerdings auch die Menge des weißen Pigments, denn hochgradige *Cl*-Tiere zeigen ausgesprochene Wucherungen des Interommatidialpigments.

Über das Augenpigmentsystem anderer Amphipoden liegen kaum solche speziellen, sondern lediglich allgemeinere Untersuchungen vor. So enthalten die zahlreichen Arbeiten über die Genetik von *Gammarus chevreuxi* von SEXTON vereinzelte Angaben, die auf ein mit dem von *Gammarus pulex* vergleichbares Pigmentsystem hinweisen. Einzelne der von SEXTON beschriebenen Mutanten lassen sogar gewisse Parallelen zu der hier analysierten genetischen Bedingtheit dieses Systems erkennen. So scheinen bestimmte rotäugige Formen ("Nowhite Reds") phänotypisch und genotypisch mit den *so*-Formen von *Gammarus pulex* übereinzustimmen. Auch der *Cl*-Faktor von *Gammarus chevreuxi*, der bei dieser Art möglicherweise monogen rezessiv vererbt wird, scheint — wenn auch im einzelnen kein direkter Vergleich mit *Gammarus pulex* möglich ist — wenigstens vorwiegend ein Verteilungsfaktor zu sein.

Ferner haben eigene stichprobenartige Prüfungen an *Gammarus locusta*, *Talitrus saltator* und *Caprelle linearis* ergeben, daß das Pigmentsystem auch dieser Amphipoden wenigstens in seiner stofflichen Grundlage weitgehend mit dem von *Gammarus pulex* übereinstimmt. Dagegen scheint das Pigmentsystem von *Carinogammarus mucronatus* wenigstens nicht in allen Einzelheiten mit dem des *Gammarus pulex* übereinzustimmen, denn EMMART (1936) beschreibt für diese Art neben einem schwarzen und einem roten auch noch ein gelbes Pigment, das bei *Gammarus pulex* nicht vorkommt.

Eingehender als diese Amphipoden sind hingegen einige Isopoden untersucht worden, wobei vor allem genetische Fragen im Vordergrund gestanden haben. Indessen zeigen alle diese Untersuchungen, insbesondere die von KOSSWIG (1936, 1939, 1940; an *Asellus aquaticus cavernicolus*), DE LATTIN (1939; an *Oniscus asellus*), VANDEL (1940; an mehreren Isopoden), ferner auch die biochemischen Untersuchungen von BECKER (1942), daß in dieser Gruppe ein offenbar sehr viel einfacheres, möglicherweise nur aus einem Pigmenttyp bestehendes System vorliegt.

Als letztes bliebe nun noch zu erörtern, inwieweit sich Parallelen zu den in dieser Hinsicht besonders gut untersuchten Insekten — als Beispiel sei hier nur *Drosophila* angeführt — finden lassen. Unabhängig von den z.T. grundsätzlichen stofflichen Verschiedenheiten der Pigmente (vgl. die Angaben von BEADLE, ANDERSON und MAXWELL 1938; EPHRUSSI und CHEVAIS 1938; DANNEEL und ZIMMERMANN 1954; FORREST and MITCHEL 1954) finden sich dennoch wenigstens eine ganze Reihe von Parallelen in der genetischen und histologischen Bedingt-

heit des abgewandelten Pigmentsystems einiger Augenfarbmutanten, bei denen bestimmte Bestandteile vermindert werden oder ausfallen. Solche Mutanten sind unter anderem *brown* (*bw*; Ausfall der roten und gelben Komponente), *sepia* (*se*; Ausfall der roten Komponente), *vermilion* und *cinnabar* (*v* und *cn*; Ausfall der braunen Komponente). Es liegen hier also Augenfarbgene vor, die sich prinzipiell auf ähnliche Weise manifestieren wie bei *Gammarus pulex*. Auch hinsichtlich des Einflusses, den Größe und Struktur der Granula auf den Farbeffekt ausüben können, bestehen deutliche Parallelen zwischen beiden Gruppen. So führt Nolte (1955) zahlreiche Mutanten an, bei denen primär rein quantitative Unterschiede des Pigments, die durch Größe, Anzahl und Lagerung der Granula verursacht werden, sekundär qualitative Farbverschiedenheiten bedingen. Es wird hier also ein Effekt hervorgerufen, der auch bei der *br*-Mutante von *Gammarus* in sehr charakteristischer Weise durch den Ausfall eines bestimmten Granulatyps zustande kommt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. de Lattin, möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine stete Teilnahme am Fortschreiten der Untersuchungen danken. Daneben gilt mein besonderer Dank den Herren Prof. Dr. W. v. Buddenbrock und Prof. Dr. H. Mislin für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Zoologischen Institut der Universität Mainz.

Nach meiner Übersiedlung nach Siebeldingen konnten die Arbeiten durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. B. Husfeld am Forschungsinstitut für Rebenzüchtung abgeschlossen werden, wofür ich ihm zu Dank verpflichtet bin.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Von dem normalerweise schwarzäugigen *Gammarus pulex* werden 5 Augenfarbvarianten, die in den Wildpopulationen in verschiedener Häufigkeit vorkommen, genetisch und histologisch untersucht. Vier davon sind durch einfach mendelnde mutierte Gene bedingt (*br*, *w*, $so_1$ und $so_2$). Die fünfte *(Clotted)* folgt einem komplizierten Erbgang: sie wird offenbar durch mehrere additiv wirkende Gene bedingt. Alle Faktoren liegen autosomal. — Pleiotropieeffekte werden besprochen.

2. Die Standardform verhält sich gegenüber *br* und *w* dominant, $so_1$ und $so_2$ semidominant und *Cl* rezessiv. Sie enthält im Auge 3 verschiedene Pigmente:

a) ein dunkles, an Trägergranula gebundenes Pigment, das in den Pigment- und Retinulazellen liegt und in 2 Granulatypen auftritt;

b) ein granuliertes weißes Interommatidialpigment;

c) ein in Fetttröpfchen gelöstes rotes Carotinoid. Es liegt in den Pigment- und Retinulazellen und wird von dem dunklen Pigment vollständig verdeckt.

3. Die *br*-Mutante, deren Augen braun gefärbt sind, ist durch einen fast vollständigen Ausfall eines Granulatyps, der bei der Standardform 80% aller Granula des dunklen Pigments bildet, gekennzeichnet.

4. Bei den Mutanten $so_1$ und $so_2$, die im Phänotyp identisch sind, ist das dunkle und das weiße Pigment vollständig ausgefallen, so daß deren Augen von dem allein vorhandenen Carotinoid leuchtend rot gefärbt sind.

5. Bei der *w*-Mutante liegt ausschließlich das weiße Interommatidialpigment vor.

6. Die *Cl*-Formen unterscheiden sich vom Standardtyp durch eine Wucherung des das weiße Pigment enthaltenden interommatidialen Bindegewebes, so daß die Augen dieser Tiere mehr oder weniger weiß erscheinen.

7. Bei keiner der untersuchten Augenfarbmutanten konnten qualitative Veränderungen des Pigments festgestellt werden. Die aberranten Augenfarbtypen kommen ausschließlich dadurch zustande, daß die beim Standardstamm vorhandenen Bestandteile der Augenpigmentierung vermindert werden (*br*), ausfallen (*w*, $so_1$ und $so_2$) oder sich gegenseitig überdecken (*Cl*).

## Literatur

ANDERS, A.: Untersuchungen über die Pigmente einiger Augenfarbmutanten von *Gammarus pulex* L. Verh. dtsch. zool. Ges. **1955**, 286. — ANDERS, F.: Über Ausbildung und Vererbung der Körperfarbe bei *Gammarus pulex ssp. subterraneus* (SCHNEIDER), einer normalerweise pigmentlosen Höhlenform des gemeinen Bachflohkrebses. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 567 (1956). — Über die geschlechtsbeeinflussende Wirkung von Farballelen bei *Gammarus pulex ssp. subterraneus* (SCHNEIDER). Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 298 (1957). — ANDERS, G.: Untersuchungen über das pleiotrope Manifestationsmuster der Mutante Lozenge-Clawless *(lz$^{cl}$)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 113 (1956). — BARNICOT, N. A., M. S. C. BIRBECK and W. F. CUCKOW: The electron microscopy of human hair pigments. Ann. hum. Genet. **19**, 231 (1955). — BEADLE, G. W., R. L. ANDERSON and I. MAXWELL: A comparision of the diffusible substances concerned with the eyecolour development in *Drosophila*, *Ephestia* and *Habrobracon*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **24** (1938). — BEATTY, R.A.: The pigmentation of cavernicolous animals. III. The carotinoid pigments of some amphipod crustacea. J. exp. Biol. **26**, 12 (1949). — BECKER, E.: Die Pigmente der Ommin-Ommatingruppe, eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. Naturwiss. **29**, 237 (1941). — Über Eigenschaften, Verbreitung und die genetisch-entwicklungsphysiologische Bedeutung der Pigmente der Ommatin-Ommin-Gruppe (Ommochrome) bei den Arthropoden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 157 (1942). — BLISS, A. F.: Derived photosensitive pigments from invertebrates eyes. J. gen. Physiol. **26** (1942). — BUTENANDT, A.: Bildung der Insekten-Ommochrome. Forsch. Fortschr. **21/23**, 54 (1947). — Biochemie der Gene und Genwirkungen. Naturwiss. **40**, 91 (1953). — CASPARI, E.: On the pigment formation in the testis sheath of *Rt* and *rt Ephestia kühniella* ZELLER. Biol. Zbl. **74**, 585 (1955). — CLAYTON, F. E.: The effekt of lozenge pseudoalleles on eye pigmentation in *Drosophila melanogaster*. Genetics **42**, 28 (1957). — DANNEEL, R.: Die Ausfärbung überlebender *v*- und *cn*-Drosophilaaugen mit Produkten des Tryptophanstoffwechsels. Biol. Zbl. **61**, 388 (1941). — Über die beiden gelbäugigen Mutanten *se v* und *se cn* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Naturwiss. **42**, 566 (1955). — DANNEEL, R., u. B. ESCHRICH: Untersuchungen über den gelben Augenfarbstoff der Mutante „*sepia*" von *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **11**b, 105 (1956). — DANNEEL, R., u. B. ZIMMERMANN: Über das Vorkommen und Schicksal des Kynurenin bei verschiedenen Drosophilarassen. Z. Naturforsch. **9**b, 788 (1954). — EMMART, E. W.: Studies on the effekt of temperature on the embryo of *Carinogammarus mucronatus*, SAY. J. exp. Zool. **74**, 353 (1936). — EPHRUSSI, B., et S. CHEVAIS: Développement des coleurs des yeux chez la Drosophila. Bull. biol France Belg. **72**, 48 (1938). — FISHER, I. R., S. K. KON and S. Y. THOMPSON: Vitamin A and carotinoids in certain invertebrates. J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. **31**, 229 (1952). — Vitamin A and carotinoids in certain invertebrates. J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. **33**, 589 (1954). — FORD, E. B., and J. HUXLEY: Genetic rate-factors in *Gammarus*. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **117**, 67 (1929). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: Pteridines from *Drosophila*. J. Amer. chem. Soc. **76**, 5656 (1954). — GREEN, M. M.: Homologous eye color mutants in the honeybee and *Drosophila*. Evolution **9**, 215 (1955). — HADORN, E.: Letalfaktoren. Stuttgart 1955. — HADORN, E., u. I. SCHWINCK: Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante (*rosy*$^2$) von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 528 (1956). — HANSER, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranula bei verschiedenen Rassen von *Ephestia kühniella* Z. und *Ptychopoda seriata* SCHRK. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 74 (1948). — HEINZE, K.: Fortpflanzung und Brutpflege bei *Gammarus pulex* und *Carinogammarus Roeseli* GERV. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **51**, 397 (1932). — KAMPA, E. M.: Euphausiopsin, a new photosensitive pigment from the eyes of euphausiid crustaceans. Nature (Lond.) **175**, 996 (1955). — KARLSON, P.:

Biochemische Wirkung der Gene. Ergebn. Enzymforsch. **13**, 85 (1954). — Kawase, S., and H. Aruga: Biochemical genetics on the pigment in eggs and the compound eyes. Jap. J. Genetics **29**, 114 (1954). — Kikkawa, H.: Nature of pigments derived from tyrosine and tryptophan in animals. Science **121**, 3133 (1956). — Kosswig, C.: Über Augenrück- und Mißbildung bei *Asellus aquaticus cavernicolus*. Verh. dtsch. zool. Ges. **1936**, 274. — Zur Farbvariabilität bei unterirdisch lebenden Wasserasseln, *Asellus aquaticus* sensu Racovitza. Mitt. Höhlen- u. Karstforsch. **39**, 94 (1939). — Die Variabilität bei *Asellus aquaticus* unter besonderer Berücksichtigung der Variabilität an isolierten unter- und oberirdischen Populationen. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B **5**, 1 (1940). — Kühn, A.: Über eine Gen-Wirkkette der Pigmentbildung bei Insekten. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. **2**, 1 (1941). — Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Lambertsen, G., and O. R. Braekkan: A possible new Vitamin $A_1$ isomer in the eyes of Crustaceans. Nature (Lond.) **176**, 553 (1955). — Lattin, G. de: Untersuchungen über die Farbvariabilität der Isopodenaugen. I. Über genotypische und modifikative Pigmentreduktion. Zool. Anz. **125**, 309 (1939). — Legrand, J. J.: Mutations alba et pseudo-alba chez l'Oniscoide *Porcellio dilatatus* Brandt. C. R. Acad. Sci. (Paris) **244**, 249 (1957). — Comportemant héréditaire du rufisme chez les Oniscoides: *Porcellio dilatatus* Br. et *Haplophthalmus danicus* B.L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **244**, 394 (1957). — Lönnberg, E.: On the occurence of carotinoid pigment in the eyes of certain animals. Ark. Zool. A **28**, 1 (1934). — Michel, A., u. F. Anders: Über die Pigmente im Auge von *Gammarus pulex* L. Naturwiss. **41**, 72 (1954). — Mühlmann, H.: Variationsstatistische Untersuchungen und Beobachtungen an unter- und oberirdischen Populationen von *Gammarus pulex* L. Zool. Anz. **122**, 71 (1938). — Nolte, D. J.: The eye-pigmentary system of Drosophila. I. The pigment cells. J. Genet. **50**, 79 (1950). — The eye pigmentary system of Drosophila. II. Phenotypic effects of gene combinations. J. Genet. **51**, 130 (1953). — The eye pigmentary system of Drosophila. The action of eye-colour genes. J. Genet. **51**, 142 (1953). — The eye pigmentary system of Drosophila. IV. The pigments of the vermilion group of mutants. J. Genet. **52**, 111 (1954). — The eye pigmentary system of Drosophila. V. The pigments of the light and dark groups of mutants. J. Genet. **52**, 127 (1954). — The eye-pigmentary sytem of Drosophila. VI. The pigments of the ruby and red groups of mutants. J. Genet. **53**, 1 (1955). — Parker, G. H.: The photomechanical changes in the retinal pigment of Gammarus. Bull. Mus. Comp. Zool. **35**, 237 (1889). — Reisener-Glasewald, E.: Über die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella* in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 668 (1956). — Schatz, E.: Bau und Entwicklung des Auges von Gammarus. Z. wiss. Zool. **135**, 549 (1929). — Schneider, R.: Der unterirdische Gammarus von Clausthal. S.-B. preuß. Akad. wiss. Berlin, phys. math. Kl. **49**, 1087 (1885). — Sexton, E. W.: Degeneration and loss of the eye in the amphipod *Gammarus chevreuxi* Sexton. J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. **18**, 355 (1932). — Sexton, E. W., and A. R. Clark: Variation in the white pigment of the eye in *Gammarus chevreuxi* Sexton, with a description of a new genetic type, the "Clotted eye". J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. **20**, 691 (1936). — A summary of the work on the amphipod *Gammarus chevreuxi* Sexton carried out at Plymouth Laboratory 1912—1936. J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. **21**, 319 (1936). — Strauss, E.: Das Gammaridenauge. Wissenschaftliche Ergebnisse der deutschen Tiefsee-Expedition **20**, 1 (1909). — Vandel, A.: Les mutations chez les isopodes terrestres. C. R. Acad. Sci. (Paris) **210**, 231 (1940). — Viscontini, M., H. Schmid u. E. Hadorn: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Astacus fluviatilis*. Experientia (Basel) **11**, 390 (1955). — Wald, G.: Vitamin A in invertebrates eyes. Amer. J. Physiol. **133**, 479 (1941). — Wald, G., and R. Hubbard: Visual pigment of a Decapod Crustacean: The lobster. Nature (Lond.) **180**, 278 (1957). — Whiting, P. W.: Comparable mutant eye colors in *Mormoniella* and *Pachycrepoideus (Hymenoptera: Pteromalidae)*. Evolution **8**, 135 (1954).

Dr. Annerose Anders, Zoologisches Institut der Universität Saarbrücken

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 116—131 (1959)

Aus dem Institut für Genetik der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem
(Direktor: Prof. Dr. H. Lüers)

# UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER GENETISCHEN WIRKSAMKEIT VON MYLERAN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER**

Von

Gunter Röhrborn

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 24. Dezember 1958)*

## Einleitung

Myleran (1,4-Dimethansulfonoxybutan) ist eines der bedeutsamsten Cytostatica, die in der Therapie von Leukämien verwendet werden. Dieses von Timmis synthetisierte Pharmakon erwies sich im Tierversuch als Tumorhemmstoff mit wesentlich geringerer toxischer Wirkung auf das Knochenmark als Stickstofflost (Haddow und Timmis 1953). Die klinische Erprobung dieses Präparates erfolgte durch Galton an Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (Galton 1953, Galton und Till 1955). Es zeigte sich seither, daß Myleranbehandlung diese an Leukämie erkrankten Menschen längere Zeit bei völligem Wohlbefinden lebens- und arbeitsfähig erhält, ein Vorzug, den andere Cytostatica nicht besitzen (Kanzow und Wolfers 1957). Myleran wirkt auf sämliche blutbildenden Organe hemmend, übt jedoch den größten depressiven Einfluß auf die Myelopoese aus (Bollag 1953a). Von allen Cytostatica ist die selektive Wirkung auf die Zellen des myeloischen Systems bei Myleran am stärksten ausgeprägt. Dies wird auch durch die Untersuchungen anderer Autoren bestätigt (Paterson 1955, Haddow 1953a). In experimentellen Untersuchungen an Ratten hemmte Myleran auch das Wachstum des Walker-Carcinoms (Timmis und Elson 1952, Oettel und Wilhelm 1954) und verzögerte das Auftreten transplantierter akuter Leukämien (McKenzie u. Mitarb. 1957). Es ist anzunehmen, daß Myleran auf alle proliferierenden Gewebe und damit auch auf die Keimzellen einwirkt. Hinweise dafür finden sich bei mehreren Autoren. So beschreiben Tanaka u. Mitarb. (1955) bei Ratten eine Störung der Spermatogenese nach Myleranapplikation. Am gleichen Objekt beobachtete Bollag (1953b) nach Myleranbehandlung, daß die Anzahl der Zellschichten der Tubuli contorti nach 30 Tagen verringert war. Nach 60 Tagen waren überhaupt keine Spermatiden und Spermatozoen mehr in den Hoden und nach 120—150 Tagen war das Keimepithel völlig zerstört. Bei weiblichen Ratten fehlten nach 80—100 Tagen alle Follikel im Ovar. Auch die vom gleichen Autor festgestellte Amenorrhoe bei einer mit Myleran behandelten Frau deutet auf eine Beeinflussung der Keimdrüsen durch dieses Medikament. Ferner konnte Bollag (1954) nachweisen, daß Ratten, denen während der Schwangerschaft Myleran injiziert wurde, sterile Nachkommen zur Welt brachten. Im *Allium cepa*-Test verursachte Myleran Kernfragmentationen und Agglutinationen (Truhaut und Deysson 1954) und J. und M. Moutschen-Dahmen (1958) wiesen an *Hordeum*

* Naturwissenschaftliche Dissertation, Freie Universität Berlin, auf Anregung von Prof. Dr. H. Lüers.

*sativum* und *Vicia faba* nach, daß durch Myleran Chromosomenaberrationen induziert werden. Demerec u. Mitarb. (1952) sowie Hemmerly und Demerec (1955) berichteten über eine schwache Mutagenität des Mylerans in Versuchen mit Bakterien, und Bird (1951) erhielt nach Injektion einer wäßrigen Myleranlösung bei *Drosophila* eine Mutationsrate von 0,5%. Leider fußt die Angabe von Bird nur auf sehr kleinem Material (2 Letalfaktoren bei 407 geprüften Chromosomen), so daß sich daraus kein sicherer Nachweis über die Induktion von Mutationen in den Keimzellen von Metazoen durch Myleran ableiten läßt[1]. Bei der häufigen Verwendung des Mylerans in der Therapie von Leukosen ist aber gerade die Lösung dieser Frage wichtig. Deshalb stellten wir uns die Aufgabe, Myleran hinsichtlich seiner mutationsauslösenden Wirkung auf das Geschlechtschromosom von *Drosophila melanogaster* zu untersuchen und zu ermitteln, welche Spermatogenesestadien gegenüber einer Myleraneinwirkung am empfindlichsten sind. Da sich während der Versuche herausstellte, daß Myleran zur Hydrolyse neigt, wurden die Hydrolyseprodukte in die Untersuchung einbezogen. Darüber hinaus galt es, auf Grund der Verteilung der induzierten Mutationen über das X-Chromosom Myleran bzw. dessen Spaltprodukte auf eine spezifische Mutationsauslösung zu prüfen.

## Material und Methodik

Die Mutagenitätsuntersuchungen wurden an den Männchen des Stammes *Berlin wild* der Spezies *Drosophila melanogaster* vorgenommen. Diese Männchen erhielten die Testsubstanzen in Anlehnung an die klinisch-therapeutische Behandlungsform nach der von Lüers (1953) angegebenen Methode per os verabreicht. Abweichungen von dieser Applikationsweise werden an den betreffenden Stellen im experimentellen Teil beschrieben. Die Behandlungsdauer (3 Tage) und das Alter der behandelten Männchen bei Versuchsbeginn (1—3 Tage) waren in allen Versuchen gleich.

Zur Prüfung gelangten.

1. 1,4-Dimethansulfonoxybutan (Myleran)[2], Formel: $H_3C-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O}{\downarrow}}{S}}-O-(CH_2)_4-O-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O}{\downarrow}}{S}}-CH_3$;

2. dessen Hydrolyseprodukte:
   a) 1,4-Butandiol, Formel: $HO-(CH_2)_4-OH$;
   b) Methylsulfonsäure[2], Formel: $H_3C-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O}{\downarrow}}{S}}-OH$;
   c) 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester[2], Formel: $H_3C-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O}{\downarrow}}{S}}-C-(CH_2)_4-OH$.

[1] Der angegebene Wert ist nicht gegenüber der Spontanrate abzugrenzen. Deshalb erscheint es uns unzulässig, Myleran auf Grund dieser Werte und einiger rechnerischer Transpolationen mit anderen Mutagenen zu vergleichen, wie es Fahmy und Fahmy (1956a) durchführten.

[2] Der Firma Burroughs Wellcome & Co. sei für die Überlassung des Mylerans und Herrn Prof. Dr. Lautsch für die Herstellung der Methylsulfonsäure und des 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureesters herzlichst gedankt.

1,4-Dimethansulfonoxybutan und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester sind der Di- bzw. Monomethylsulfonsäureester des Glykols 1,4-Butandiol. Die jeweilige Dosierung der Substanzen wird in den einzelnen Experimenten angegeben. Als Lösungsmittel diente eine 5%ige wäßrige Zuckerlösung, um bei den Fliegen die Bereitschaft zur oralen Aufnahme der zu prüfenden Stoffe zu erhöhen. In einem Kontrollversuch wurde dieses Lösungsmittel zwecks erneuter Prüfung der spontanen Mutationsrate einem Mutagenitätstest unterworfen.

Die Raten rezessiver geschlechtsgebundener Letalmutationen *sensu stricto* wurden mit der *Muller-5*-Methode ermittelt. Die aufgetretenen sichtbaren und semiletalen Mutationen des X-Chromosoms wurden mit diesem Verfahren gleichfalls festgestellt, jedoch nicht zur Berechnung der Mutationsraten herangezogen.

Unmittelbar nach der Behandlung erfolgte die Paarung der *Berlin wild*-♂♂ mit virginen *Muller-5*-♀♀. Nach jeweils 3 Tagen wurden die Ausgangs-♂♂ mit neuen *Muller-5*-♀♀ gepaart und die Letalmutationsrate in 3 bzw. 10 aufeinanderfolgenden Zuchtserien bestimmt, um eine gewisse analytische Fraktionierung der zur Zeit der Behandlung vorliegenden Spermatogenesestadien zu erreichen.

Die Nachkommenschaft jedes behandelten P-♂ wurde gesondert weitergeführt. Dadurch können die in den verschiedenen Serien möglicherweise auftretenden Gruppen von Mutationen, die von einem einzelnen Männchen stammen, ermittelt und durch genetische Analyse auf ihre Identität geprüft werden. Da Allelietests bei geschlechtsgebundenen Letalmutationen nicht durchgeführt werden können, erfolgte dies mittels des Lokalisationsverfahrens, durch das Identität bzw. Allelie zwar nicht bewiesen, aber in vielen Fällen ausgeschlossen werden kann.

Das Auftreten von Gruppen identischer Mutationen bei *Drosophila* kann als Indiz für eine mutagene Wirkung auf prämeiotische Keimzellstadien gewertet werden. Die fehlerkritische Auswertung der Mutationsversuche erfolgte nach der Methode von STEVENS (1942) unter Angabe der oberen und unteren Grenzen bei 99%iger Sicherheit. Die Lokalisierung erfolgte nach dem Rückkreuzungsverfahren mit einem *Xple*-Stamm, dessen Geschlechtschromosom die Markierungsgene *sc ec ct v g f* aufwies. Es wurden fast ausnahmslos Letalfaktoren lokalisiert. Vereinzelt wurden auch sichtbare Mutationen einem Lokalisations- und bzw. oder Allelietest unterworfen. Um Übervölkerung zu vermeiden, wurden in den Lokalisationskreuzungen jeweils nur ein heterozygotes Weibchen und zwei *sc ec ct v g f*-♂♂ gepaart und nach 3 Tagen aus den Kulturgläsern entfernt. Die Zuchttemperatur betrug in allen Lokalisationsversuchen 25 $\pm$ 0,5° C. Der Locus wurde auf Grund der Austauschhäufigkeit zwischen der geprüften Mutation und den benachbarten Markierungsgenen anhand der Männchen berechnet. Mutationen zwischen *f* und der Spindelfaseransatzstelle (terminal) wurden in ihrer Lage mittels des Austauschwertes zwischen *f* und der zu lokalisierenden Mutation bestimmt. Bis auf eine Ausnahme wurden stets mehr als 200 ♂♂ protokolliert. Auch die Weibchen wurden ausgezählt, um das Auftreten von Chromosomenmutationen registrieren zu können. Letztere werden an einer gleichsinnigen Austauschstörung in beiden Geschlechtern erkannt. Bestehende Differenzen zwischen theoretischer und empirischer Austauschhäufigkeit wurden mit der $\chi^2$-Methode auf ihre Signifikanz geprüft.

## Versuchsergebnisse

### *I. Mutagenitätsuntersuchungen*

In Kontrollversuchen hatte sich bereits in früheren Untersuchungen am gleichen Stamm eine 5%ige wäßrige Zuckerlösung als nicht mutagen erwiesen (LÜERS 1955). Ein nochmals unter gleichen Bedingungen und über 10 Serien durchgeführter Versuch brachte auf 2667 untersuchte X-Chromosomen zwei rezessive Letalmutationen. Die Mutationsrate betrug also 0,08% (Grenzen nach STEVENS für 99%ige Sicherheit 0,35/0,004%). Die eine Mutation war in Serie III, die andere in Serie VII bei zwei verschiedenen Männchen aufgetreten.

Die Applikation von Myleran an *Drosophila* stieß gleich zu Beginn auf große Schwierigkeiten. Einerseits ist Myleran in Wasser nur schwer löslich und neigt zur Hydrolyse. (Diese bei Zimmertemperatur kaum merkliche Tendenz wird durch Erhitzen wesentlich verstärkt.) Andererseits ist die orale Verabfolgung einer Substanz an *Drosophila*-Imagines kaum anders als in wäßriger Lösung möglich.

Deshalb wurde versucht, die Hydrolyse so stark wie möglich einzuschränken. In einem Vorversuch wurden die Testfliegen mit einer 0,0023%igen Lösung von Myleran in 5%igem Zuckerwasser behandelt (Tabelle 1a, Vorversuch). Da das Ergebnis eine schwache mutagene Wirkung des Mylerans andeutete, wurde unter den gleichen Bedingungen ein 10-Serien-Versuch größeren Umfanges durchgeführt. Dieses Experiment erbrachte entsprechende Befunde (Tabelle 1a, Hauptversuch) und lieferte zudem ein weiteres Indiz für eine mutagene Wirkung des Mylerans. In den Serien III IV wurde nämlich eine Gruppe von vier identischen sichtbaren Mutationen *(yellow)* gefunden. Der Nachweis ihrer Identität erfolgte durch Allelietests. Auffällig ist das Absinken der Mutationsrate in den höheren Serien (Serie IV—X: keine Letalmutation auf 2149 geprüfte Chromosomen). Dies deutet auf eine geringere Empfindlichkeit von Spermatogonien im Vergleich zu reiferen Keimzellstadien gegenüber Myleran.

In einem weiteren Versuch (b) wurde eine 2%ige Lösung von Myleran in Pyridin bereitet. Es zeigte sich, daß Pyridin bis zu einem Verdünnungsgrad von einem Teil Pyridin auf 400 Teile Zuckerwasser auf *Drosophila* stark toxisch wirkt. Deshalb wurde die 2%ige Lösung von Myleran in Pyridin vor jeder Verfütterung mit der 400 fachen Menge Zuckerwasser verdünnt und somit eine 0,005%ige Lösung von Myleran in Pyridin-Zuckerwasser hergestellt. Diese Lösung wurde vor jedem Füttern frisch bereitet, um eine Hydrolyse des Mylerans zu vermeiden. Auch in diesem Experiment war die Mutationsrate niedrig, aber gegenüber den Kontrollen erhöht.

Ein ähnliches Ergebnis wie die vorhergehenden Experimente zeitigte der nächste Versuch (c).

In dem Bemühen, eine möglichst hohe Dosis an unzersetztem Myleran von den Fliegen aufnehmen zu lassen, wurde Filterpapier mit dem Durchmesser der als Futtergläschen verwendeten Glasfiltertiegel mit einer 2%igen Lösung von Myleran in Pyridin getränkt. Von diesem Papier wurde das Pyridin zunächst 10 min im Exsikkator und darauf mindestens 3 Std im Abzug verflüchtigt. Zurück blieb nur fein verteiltes Myleran. Für die Dauer von 3 Tagen wurden solche Filterpapiere 3mal täglich neu auf den Boden eines Glasfiltertiegels gelegt. Durch den porösen Boden der Tiegel stieg ständig Zuckerwasser auf, tränkte das Filterpapier und löste bzw. suspendierte das Myleran für die orale Aufnahme durch die Fliegen (Abb. 1). Zwar ist die Konzentration der Lösung nicht bestimmbar, doch zeigte sich auch hier eine Erhöhung der Mutationshäufigkeit gegenüber dem Kontrollversuch (c). Ein Kontrolltest mit Pyridin erübrigte sich, da aus einem Vergleich der Tabelle 1b mit den Tabellen 1a und c hervorgeht, daß diese Verbindung nicht mutagen wirkt.

Faßt man die Serien I—III der bisher angeführten Mutationsversuche mit Myleran am Stamm *Berlin wild* (Tabelle 1a—c) zusammen und stellt sie dem gesamten, am gleichen Stamm gewonnenen Kontrollmaterial (Lüers 1955, Röhrborn) gegenüber, so ergibt sich eine statistisch gesicherte Differenz zwischen den beiden Mutationsraten (Tabelle 2). Damit ist eine schwache Mutagenität des Mylerans nachgewiesen. Bei dieser Berechnung wurden die Serien IV—X aus Tabelle 1a (Hauptversuch) nicht verwendet; aber auch unter Einbeziehung dieser Serien (untere Grenze = 0,25) ergibt sich noch eine gesicherte Differenz gegenüber den Kontrollen.

Da Myleran zur Hydrolyse neigt, wurde in weiteren Experimenten geprüft, ob nicht nur Myleran selbst, sondern auch eines oder mehrere seiner *Hydrolyseprodukte* mutagen wirken. Zunächst wurde in 2 Versuchen Myleran durch Erhitzen einer 1%igen Suspension von Myleran in 5%igem Zuckerwasser weitgehend

hydrolysiert. (Diese beiden Experimente werden im folgenden Teil Hydrolyseversuch 1 bzw. 2 genannt.)

Die Suspension wurde 30 min auf 90° C und anschließend bis zum Siedepunkt erhitzt; letzteres wurde vor jedem Verfüttern wiederholt. In den vorausgegangenen Experimenten mit einer 0,0023%igen Lösung von Myleran in Zuckerwasser hatte sich bei Zimmertemperatur nach 3 Tagen trotz wiederholten Schüttelns das Myleran nicht völlig gelöst. Die Lösung muß also für diese Temperatur gesättigt gewesen sein. Die bis zum Siedepunkt erhitzte 1%ige Myleran-Zuckerwasser-Suspension wurde vor jedem Verfüttern langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. Ein Übersättigungseffekt konnte ausgeschlossen werden. Deshalb ist anzunehmen, daß an unzersetztem Myleran hier nicht mehr als in den oben erwähnten Versuchen in Lösung war. Sollten in den Hydrolyse-Versuchen die Mutationsraten größer sein als in jenen Untersuchungen, in denen die Hydrolyse eingeschränkt wurde, dann muß dies auf eines

Tabelle 1. *Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalfaktoren nach Behandlung mit unhydrolysiertem Myleran*

| Serie Nr. | Zahl der geprüften X-Chromosomen | Zahl der letalen Mutationen | Prozentsatz der letalen Mutationen |
|---|---|---|---|
| *a) 0,0023%ige Lösung von Myleran in Zuckerwasser*[1] | | | |
| Vorversuch | | | |
| I | 143 | 1 | 0,69 |
| II | 46 | — | — |
| III | 126 | — | — |
| I—III | 315 | 1 | 0,32 |
| Hauptversuch | | | |
| I | 882 | 3 | 0,34 |
| II | 500 | 2 | 0,40 |
| III | 388 | 2 | 0,52 |
| IV | 460 | — | — |
| V | 332 | — | — |
| VI | 188 | — | — |
| VII | 352 | — | — |
| VIII | 258 | — | — |
| IX | 336 | — | — |
| X | 223 | — | — |
| I—III | 1770 | 7 | 0,40 |
| IV—X | 2149 | — | 0,00 |
| *b) 0,005%ige Lösung von Myleran in Pyridin-Zuckerwasser* | | | |
| I | 140 | — | — |
| II | 300 | 1 | 0,33 |
| III | 431 | 4 | 0,93 |
| I—III | 871 | 5 | 0,55 |
| *c) Lösung von Myleran in Pyridin-Zuckerwasser* | | | |
| I | 365 | 1 | 0,27 |
| II | 433 | 4 | 0,29 |
| III | 129 | 2 | 1,55 |
| I—III | 927 | 7 | 0,76 |

[1] Substanz trotz 3tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur und wiederholten Schüttelns nicht völlig gelöst.

Tabelle 2. *Gegenüberstellung der Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalfaktoren der in Tabelle 1 aufgeführten Mutationsversuche (Serien I—III, obere Reihe) und der unbehandelten Kontrollen (untere Reihe)*

| Zahl der geprüften X-Chromosomen | Zahl der letalen Mutationen | Prozentsatz der letalen Mutationen | Grenzen nach STEVENS für 99%ige Sicherheit |
|---|---|---|---|
| 3883 | 20 | 0,50 | 0,89<br>0,26 |
| 10536 | 11 | 0,10 | 0,22<br>0,04 |

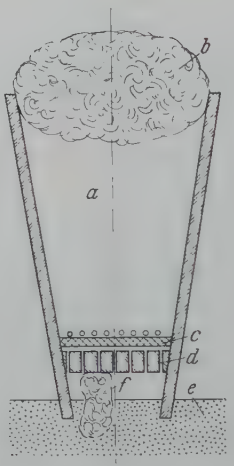



Abb. 1. Schematische Darstellung der im Text beschriebenen Applikationsweise. *a* Aufenthaltsraum für Fliegen; *b* Watteverschluß; *c* Filterpapier mit fein verteiltem Myleran; *d* poröser Boden des Glasfiltertiegels; *e* Zuckerwasserlösung; *f* Filterpapierstreifen zum Emporleiten des Zuckerwassers

oder mehrere dieser Hydrolyseprodukte zurückzuführen sein, und eine genetische Prüfung der einzelnen Hydrolyseprodukte des Mylerans wird zeigen, welches derselben mutagen wirkt.

Die Tabellen 3a und b lassen erkennen, daß in den Hydrolyseversuchen tatsächlich eine signifikante Erhöhung der Mutationsraten gegenüber den vorhergehenden Experimenten eintrat (vgl. die jeweiligen Grenzen nach STEVENS).

Tabelle 3. *Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalfaktoren nach Behandlung mit hydrolysiertem Myleran*

| Serie Nr. | Zahl der geprüften X-Chromosomen | Zahl der letalen Mutationen | Prozentsatz der letalen Mutationen | Grenzen nach STEVENS für 99%ige Sicherheit |
|---|---|---|---|---|
| a) 1. Hydrolyseversuch | | | | |
| I | 633 | 11 | 1,74 | |
| II | 357 | 5 | 1,33 | |
| III | 615 | 9 | 1,46 | |
| I—III | 1605 | 25 | 1,56 | 2,71<br>0,72 |
| b) 2. Hydrolyseversuch | | | | |
| I | 956 | 18 | 1,88 | |
| II | 886 | 24 | 2,71 | 4,71<br>1,17 (für II) |
| III | 396 | 6 | 1,52 | |
| IV | 391 | 4 | 1,02 | |
| V | 245 | 4 | 1,63 | |
| VI | 416 | 3 | 0,72 | |
| VII | 127 | 1 | 0,79 | |
| VIII | 352 | — | — | |
| IX | 149 | 1 | 0,67 | |
| X | 260 | 1 | 0,38 | |
| I—III | 2238 | 48 | 2,15 | 3,25<br>1,27 |
| I—V | 2874 | 56 | 1,95 | 2,43<br>1,23 |
| VI—X | 1304 | 6 | 0,50 | 1,20<br>0,10 |
| a und b I—III | 3843 | 73 | 1,89 | 2,64<br>1,28 |

Die Unterschiede zwischen den Mutationsraten beider Versuche überschreiten nicht die Fehlergrenzen. Gleiches gilt für die ersten 3 Serien innerhalb jedes einzelnen Versuches. Auffällig ist dagegen das Absinken der Mutationshäufigkeit von Serie V zu Serie VI im zweiten Hydrolyseversuch und ihr gleichmäßig niedriges Niveau in den folgenden Serien. Stellt man die gesammelten Werte der Serien I—V denen der Serien VI—X fehlerkritisch gegenüber, so zeigt sich, daß die Differenz zwischen diesen Werten signifikant ist. Ebenfalls sank auch in dem vorangegangenen 10-Serienversuch (Tabelle 1a) die Mutationsrate in höheren Serien ab. Es ist daher anzunehmen, daß reifere Stadien der Spermatogenese für den mutagenen Reiz der Testsubstanz empfindlicher sind als Spermatogonien.

Im Anschluß an die positiven Ergebnisse der Hydrolyseversuche wurde in Literaturstudien ermittelt, daß die Hydrolyse des Mylerans zu folgenden Reaktionsprodukten führt: 1. *Butandiol*, 2. *Methylsulfonsäure* und 3. *1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester* (vgl. ROSS 1953, HOMER 1954, GLOMBITZA und LESSER 1954, KURRLE 1955, KLAGES 1957 sowie TRAMS u. Mitarb. 1957). Diese 3 Hydrolyseprodukte wurden ebenfalls einer genetischen Prüfung unterworfen. Unter der Voraussetzung, daß theoretisch Myleran in jedes der 3 Hydrolyseprodukte quantitativ übergeführt werden kann, wurde jeweils die Menge eines Spaltproduktes in den Versuch eingebracht, die durch die Hydrolyse der 1%igen wäßrigen Suspension von Myleran maximal entstehen konnte. Aus einem Mol Myleran können 1 Mol 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester bzw. 1 Mol 1,4-Butandiol bzw. 2 Mol Methylsulfonsäure entstehen. Daher wurden von den beiden ersten Verbindungen äquimolare, von Methylsulfonsäure jedoch zweifach

molare Lösungen (bezogen auf eine 1%ige Myleranlösung) hergestellt und auf eine mögliche mutagene Wirksamkeit in Versuchen über jeweils 3 Serien getestet. (Im folgenden sind die aus dem jeweiligen Mol-Verhältnis errechneten Gewichtsprozente der betreffenden Testsubstanz angegeben.)

Es zeigte sich, daß weder eine 0,3814%ige Lösung von 1,4-Butandiol in Zuckerwasser (1. Versuch: auf 1039 geprüfte Chromosomen 4 Letalmutationen = 0,38%; 2. Versuch: auf 1959 geprüfte Chromosomen 5 Letalmutationen = 0,25%) noch eine 0,8134%ige Lösung von Methylsulfonsäure in Zuckerwasser (1. Versuch: auf 2081 geprüfte Chromosomen 6 Letalmutationen = 0,29%; 2. Versuch: auf 1333 geprüfte Chromosomen 4 Letalmutationen = 0,30%) mutagen wirkten.

Tabelle 4. *Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalfaktoren nach Behandlung mit einer 0,8118%igen Lösung*[1] *von 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester in Zuckerwasser*

| Serie Nr. | Zahl der geprüften X-Chromosomen | Zahl der letalen Mutationen | Prozentsatz der letalen Mutationen | Grenzen nach STEVENS für 99%ige Sicherheit |
|---|---|---|---|---|
| | | 1. Versuch | | |
| I | 1157 | 14 | 1,21 | |
| II | 904 | 11 | 1,22 | |
| III | 762 | 8 | 1,05 | |
| I—III | 2823 | 33 | 1,17 | 1,88<br>0,63 |
| | | 2. Versuch | | |
| I | 471 | 12 | 2,55 | |
| II | 385 | 8 | 2,08 | |
| III | 338 | 6 | 1,78 | |
| I—III | 1194 | 26 | 2,18 | 3,79<br>0,98 |
| I—III gesamt | 4017 | 59 | 1,47 | 2,07<br>0,89 |

Dagegen ist die Erhöhung der Mutationsrate durch 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester (Tabelle 4) sowohl gegenüber den Kontrollen als auch gegenüber den zusammengefaßten Experimenten unter Vermeidung von Hydrolyse (Tabelle 2) signifikant. Daher ist zweifellos für die in den Hydrolyseversuchen ausgelösten Mutationen hauptsächlich 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester verantwortlich. Möglicherweise war trotz des starken Erhitzens der 1%igen Myleran-Zuckerwasser-Suspension in den Hydrolyseversuchen etwas Myleran unzersetzt geblieben. Eine Beteiligung unhydrolysierten Mylerans an den Mutationsraten dieser Versuche kann deshalb nicht ausgeschlossen werden; sie ist aber sicher sehr gering (vgl. Tabelle 1).

### *II. Lokalisationsuntersuchungen*

56 rezessiv letale und 11 sichtbare[2] geschlechtsgebundene Mutationen, die in den Mutagenitätsuntersuchungen auftraten, wurden hinsichtlich ihrer Lage auf dem X-Chromosom geprüft. Unter den rezessiv letalen Mutationen befand sich eine Chromosomenmutation. Der Anteil genetisch erfaßter Chromosomenmutationen an der Gesamtzahl der rezessiven geschlechtsgebundenen Letalmutationen betrug somit 1,8%. Alle anderen Mutationen verhielten sich im Lokalisationstest wie Punktmutationen (oder minute rearrangements).

Vier sichtbare Mutationen *(yellow)* erwiesen sich im Allelietest als identisch und können auf ein gemeinsames Mutationsereignis in einer unreifen Keimzelle zurückgeführt werden. Alle anderen lokalisierten Mutationen sind unabhängig

[1] Substanz nur schwach gelöst, der größte Teil wurde fein suspendiert verabreicht.

[2] Insgesamt traten in den Mutationsexperimenten 18 sichtbare Mutationen auf.

voneinander entstanden; sie traten entweder einzeln auf oder in Gruppen, für die Identität ausgeschlossen werden konnte. Erwähnt sei noch, daß Gruppen von Letalmutationen selten, dann aber vor allem in jenen Serien auftraten, in denen eine höhere Mutationsrate es wahrscheinlich macht, daß ein Männchen mehrere Mutationen in der gleichen Serie liefert. Es wird daher auch durch diese Befunde bestätigt, daß reifere Stadien der Spermatogenese gegenüber Myleran und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester empfindlicher sind als prämeiotische Keimzellstadien.

Die Verteilung spontaner Mutationen über ein Chromosom wird im allgemeinen als eine Funktion der Gendichte aufgefaßt. Gesicherte Abweichungen von einer solchen Verteilung lassen darauf schließen, daß von einem Mutagen gewisse Loci selektiv angegriffen werden. Leider ist eine solche spezifische Wirksamkeit eines Mutagens bei *Drosophila* nur schwierig nachzuweisen. Wählt man die zu betrachtenden Chromosomenbereiche zu klein, werden die experimentellen Fehler zu groß. Wählt man die Regionen groß genug, kann man zwar sichere Aussagen machen, erfaßt aber nicht die feinen Unterschiede zwischen verschiedenen Verteilungen. Dennoch empfiehlt sich die zweite Methode aus praktischen Gründen. Eine weitere Erschwerung ist, daß Ergebnisse mehrerer Untersucher an unterschiedlichen Stämmen der gleichen Art schwer vergleichbar sind (Stern 1957).

Tabelle 5. *Verteilung der spontanen und der in den Hydrolyseversuchen induzierten Mutationen über die genetische Karte des X-Chromosoms von D. melanogaster*

| | Chromosomenregion | | | | | | Summe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *sc—ec* | *ec—ct* | *ct—v* | *v—g* | *g—f* | f—SpA | |
| a) Spontane Mutationen (Belitz 1957) | | | | | | | |
| *n* | 33 | 16 | 11 | 15 | 17 | 10 | 102 |
| % | 32,4 | 15,7 | 10,8 | 14,7 | 16,7 | 9,8 | |
| b) Durch Myleran induzierte Mutationen | | | | | | | |
| *n* | 13 | 6 | 7 | 10 | 13 | 3 | 52 |
| % | 25,0 | 11,5 | 13,5 | 19,2 | 25,0 | 5,8 | |
| c) Vergleich beider Verteilungen (*P*-Werte) | | | | | | | |
| | 0,34 | 0,48 | 0,66 | 0,47 | 0,20 | 0,44 | |

*P*-Wert für die Gesamtverteilungen: 0,50

Es ist daher günstig, daß die einzige umfangreiche Verteilungsprüfung spontaner geschlechtsgebundener Mutationen bei *Drosophila* an dem gleichen Stamm gemacht worden ist, an dem auch die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden (Belitz 1957). Auch die Methodik war bei beiden Experimentatoren einheitlich, so daß die gewonnenen Verteilungen ohne Einschränkung miteinander verglichen werden können. Die Tabelle 5a bringt zunächst die Verteilung spontaner Mutationen über das X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* nach Belitz.

Für die Verteilungsprüfung der in den eigenen Versuchen induzierten Erbänderungen wurden nur Mutationen aus Experimenten mit den höchsten Mutationsraten, nämlich den Serien I—III der beiden Hydrolyseversuche (Tabelle 3a und b) verwendet (Tabelle 5b), um den Anteil an spontanen Mutationen bei dieser Prüfung so niedrig wie möglich zu halten. Betrachtet man die in den Tabellen 5a und b dargestellten Mutationsverteilungen, so zeigen sich vor allem in den Regionen *sc—ec* und *g—f* Abweichungen zwischen ihnen. Jede Region beider Verteilungen sowie deren Gesamtheit wurde unter Anlegen der Nullhypothese mittels des $\chi^2$-Verfahrens geprüft. Die errechneten *P*-Werte sind in Tabelle 5c

angegeben. Diese Auswertung zeigt, daß sich beide Verteilungen in keiner ihrer Regionen und auch nicht in ihrer Gesamtheit signifikant unterscheiden. Eine spezifische mutagene Wirkung der geprüften Verbindungen läßt sich aus den Experimenten also nicht ableiten. Es ist daher wahrscheinlich, daß sich die in den Mutagenitätsuntersuchungen induzierten Mutationen proportional den spontanen Erbänderungen über das X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* verteilen.

## Diskussion

Myleran (1,4-Dimethansulfonoxybutan) erwies sich im Mutationstest bei *Drosophila* als schwach mutagen. Die Neigung dieser Verbindung zu hydrolysieren ließ vermuten, daß nicht nur Myleran selbst, sondern auch eines oder mehrere seiner Hydrolyseprodukte wirksam sein könnten. Die mutationsgenetische Prüfung der Spaltprodukte bestätigte diese Annahme. Auch nach Verfütterung von 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester, einem ziemlich stabilen Zwischenprodukt der Hydrolyse des Mylerans, wurde eine Erhöhung der Mutationsrate festgestellt. Die Hydrolyseprodukte 1,4-Butandiol und Methylsulfonsäure erwiesen sich dagegen als nicht mutagen. Ob die gesamte mutagene Wirkung von Myleran auf dessen Spaltprodukt 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester zurückgeht, kann nicht entschieden werden. Diese Befunde stimmen damit überein, daß Myleran cytostatisch wirkt, 1,4-Butandiol aber nicht (FISCHER, KOPF, LOESER und MEYER 1949, GLOMBITZA und LESSER 1954). Auf Grund ihrer Ergebnisse mit Butandiol am Blutbild und an den Keimdrüsen von Ratten schlossen GLOMBITZA und LESSER, daß der aktive Bestandteil des Mylerans die Methylsulfonsäure sei; eine experimentelle Erprobung dieser Substanz erfolgte jedoch nicht. 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester wurde bisher ebenfalls nicht auf eine mögliche cytostatische Wirksamkeit getestet.

Wie in den eigenen Versuchen wird Myleran auch in der Chemotherapie menschlicher Leukosen per os verabreicht. Gerade im Magen-Darmkanal sind die Bedingungen für eine Hydrolyse solcher Verbindungen sehr günstig (ROSS 1953). Daß Myleran im Wirbeltierorganismus in der beschriebenen Weise zu hydrolysieren scheint, geht aus einer Arbeit von TRAMS u. Mitarb. (1957) hervor. Diese Autoren untersuchten Aufnahme, Verteilung und Abbau von radioaktiv markiertem Myleran bei Ratten und wiesen beträchtliche Mengen Methylsulfonsäure im Harn nach.

Im allgemeinen besteht eine große Übereinstimmung zwischen mutagener und cytostatischer Wirkung. Darüber hinaus gleichen sich Myleran und der Monomethylsulfonsäureester des 1,4-Butandiols in ihrem chemischen Verhalten, da beide Verbindungen Ester der Methylsulfonsäure mit demselben Alkohol sind. Es ist daher möglich, daß auch in der Behandlung leukämischer Patienten ein Teil der cytostatischen Wirkung des Mylerans auf die letztgenannte Substanz zurückzuführen ist. Vielleicht würden sich mit ihr sogar bessere therapeutische Erfolge erzielen lassen als mit Myleran. Nachteilig für Myleran ist nämlich, daß wegen seiner äußerst geringen Wasserlöslichkeit und der damit verbundenen schlechten Resorbier- und Transportierbarkeit gegenüber anderen Cytostatica der Eintritt des cytostatischen Effekts stark verzögert wird (BURKL und KELLNER 1954, BIERMAN, KNUDSON, KELLY und TIMMIS 1957). Der Monoester ist etwas stärker

wasserlöslich als Myleran. Es wäre denkbar, daß er deshalb schneller zur Wirkung kommt als der Diester (Myleran), ohne die Vorteile desselben (geringe Toxizität, gute Verträglichkeit) einzubüßen. Vielleicht ist aber auch die Applikation des Dimethylsulfonsäureesters des 1,4-Butandiols zu therapeutischen Zwecken geeigneter als die der Monoesterform. Möglicherweise würde nämlich der verabfolgte Monoester bereits im Magen-Darmtrakt zu Butandiol und Methylsulfonsäure hydrolysiert werden, die auf Grund der vorliegenden Untersuchungen wahrscheinlich cytostatisch unwirksam sind. Bei Verabreichung der Diesterform dauert der Abbau zu Butandiol und Methylsulfonsäure länger als bei Applikation des Monoesters, da letzterer ein Hydrolysezwischenprodukt des Diesters ist. Dadurch könnte mehr reaktionsfähige Substanz (Myleran und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester) an den Ort gelangen, wo die cytostatische Wirkung ausgeübt werden soll. Der Diesterform käme somit eine wichtige Schutz- und Transportfunktion zu. Auf jeden Fall erscheint es auf Grund der beschriebenen Mutationsexperimente angebracht, 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester auf eine mögliche zytostatische Wirkung zu prüfen.

Sowohl Myleran als auch 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester sind Alkylierungsmittel. Auch aus der Literatur sind zahlreiche alkylierende Agentien mit mutagener Wirksamkeit bekannt (Auerbach, Robson und Carr 1947, Bird und Fahmy 1953, Kølmark und Giles 1955, Fahmy und Fahmy 1956a, 1957a). Die biologische Wirkung alkylierender Substanzen beruht nach neueren Vorstellungen auf einer Reaktion mit nukleophilen Zentren in der Zelle (Ross 1951, 1953, 1958, Haddow 1953b, Kurrle 1955). Lange Zeit glaubte man, daß derartige Stoffe mindestens zwei reaktive Gruppen aufweisen müßten, weil sich zunächst nur polyfunktionelle Verbindungen als biologisch wirksam erwiesen. Dies führte zu der Hypothese der „cross-linking-alkylation", der kreuzweisen Verknüpfung von Chromatiden durch polyfunktionelle Verbindungen mit nachfolgendem Chromosomenbruch (Goldacre, Loveless und Ross 1949, Loveless und Ross 1950). Wenig später wiesen jedoch Biesele u. Mitarb. (1950) nach, daß auch monofunktionelle alkylierende Verbindungen cytostatisch wirken, und Auerbach und Moser (1950), Kirk und Westergaard (1950) sowie Stevens und Mylroie (1950) berichteten über eine mutagene Wirksamkeit derartiger Stoffe. Da diese Stoffe entweder ein unstabiles dreigliedriges Ringsystem enthielten (z. B. Monoepoxyde und Äthylenimine), oder in der Lage waren, ein solches vorübergehend auszubilden (zyklisches Äthylenimonium-Ion der Loste), glaubten Biesele u. Mitarb., daß dies das wirksame Prinzip alkylierender Substanzen sei. Nach anderen Vorstellungen soll deren biologische Wirksamkeit auf der Fähigkeit zur Ausbildung linearer Polymeren mit reaktiven Seitenketten beruhen (Rose u. Mitarb. 1950). Stoffe wie beispielsweise Myleran weisen jedoch weder diese letzteren Eigenschaften auf noch können sie heterozyklische dreigliedrige unstabile Ringsysteme bilden (Sexton 1958). Da sie alle Charakteristika biologisch wirksamer alkylierender Agentien besitzen, ist es unwahrscheinlich, daß die genannten Vorstellungen allgemeine Gültigkeit besitzen (vgl. Ross 1953). Von größter und wohl allgemeingültiger Bedeutung scheint dagegen eine Theorie zu sein, die Ross 1953 in umfassender und übersichtlicher Weise mit vielen experimentellen physikalisch-chemischen Belegen ausführt. Nach dieser seither vielfach bestätigten Theorie sollen radiomimetische Verbindungen wie Schwefel- und Stickstoffloste,

Methylolamide, Äthylenimine, Epoxyde und einige Sulfonsäureester[1] ihre biologische Wirkung durch eine Carbenium-Ionen-Reaktion ausüben (Ross 1951, 1953, 1958; vgl. auch Ross 1949, 1950, Loveless und Revell 1949, Haddow 1951, 1953b, 1955, Alexander 1954, Homer 1954, Kurrle 1955, Badger 1956). [Alle genannten Typen von Verbindungen sind chemisch als alkylierende Agentien zu betrachten (Ross 1953).]

Es ist vielfach geprüft worden, mit welchen Gruppen Carbenium-Ionen reagieren können (vgl. Ross 1951, 1953, 1958, Haddow 1953b). Ein Carbenium-Ion ist elektrophil (+) und wird prinzipiell mit nukleophilen Zentren (—) reagieren. In Proteinen sind unter physiologischen Bedingungen die reaktivsten Zentren die ionisierten Carboxylgruppen; darauf folgen terminale α-amino- und Histidinaminogruppen. In Nukleinsäuren reagieren Carbenium-Ionen vorzugsweise mit Phosphorsäuregruppen und dem aromatischen Typ von Aminogruppen (vgl. Ross 1951, 1953, 1958, Haddow 1953b, Alexander 1954, Homer 1954). Auch für Myleran wurde eine Reaktion mit Nukleinsäurephosphatgruppen experimentell nachgewiesen (vgl. Ross 1953).

Die Anschauungen von Ross u. Mitarb. werden auch durch Untersuchungen von Loveless (1951) erhärtet, der eine beträchtliche Anzahl mono- und polyfunktioneller alkylierender und esterifizierender Agentien auf radiomimetische Wirksamkeit bei *Vicia* testete und feststellte, daß nur die Verbindungen mit der Fähigkeit nach dem Carbenium-Ionen-Prinzip zu reagieren, aktiv waren. Ausgehend von diesen Vorstellungen prüften Kølmark und Giles (1955) eine Serie von Monoepoxyden auf ihre Mutagenität am „*adenineless*-Locus" von *Neurospora*. Sie fanden, daß die mutagene Wirksamkeit dieser Verbindungen der Stärke der von ihnen gebildeten Carbenium-Ionen positiv korreliert ist.

Aus diesen Erwägungen heraus darf man vermuten, daß der Di- und der Monomethylsulfonsäureester des 1,4-Butandiols, die sich in unseren Versuchen als deutlich mutagen erwiesen, auch bezüglich der Mutationsauslösung einer Carbenium-Ionen-Reaktion folgen. Diese Annahme wird dadurch experimentell gestützt, daß in den vorliegenden Untersuchungen diejenigen Spaltprodukte des Mylerans, die unter physiologischen Bedingungen keine Carbenium-Ionen bilden können, auch keine Mutationen induzierten. Darüber hinaus zeigte sich erneut die mutagene Wirkung monofunktioneller Verbindungen (1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester). Gleichfalls erwies es sich, daß auch Substanzen wie der Di- und der Monomethylsulfonsäureester des 1,4-Butandiols, die weder ein dreigliedriges heterozyklisches Ringsystem besitzen noch zur vorübergehenden inneren Ringbildung und auch nicht zur Ausbildung linearer Polymeren neigen, Mutationen auslösen können. Eine Ringbildung z. B. mit Aminogruppen im Organismus kann für Myleran nicht völlig ausgeschlossen werden, ist aber für den Monoester des 1,4-Butandiols äußerst unwahrscheinlich. Die Befunde bestätigen somit indirekt die „Carbenium-Ionen-Theorie", indem sie den älteren Vorstellungen über die biologische Wirksamkeit alkylierender radiomimetischer Substanzen widersprechen.

Diese Annahme schließt natürlich nicht aus, daß auch die anderen angeführten oder weitere Mechanismen zusätzlich wirksam sein können. Im Vergleich zu anderen alkylierenden Verbindungen (TEM — Lüers 1953, Diepoxybutan —

[1] Hierher gehören Myleran und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester.

Bird 1952)[1] ist die Mutationsrate nach Behandlung mit Myleran und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester niedrig, obwohl die beiden letzgenannten Stoffe in einer wesentlich höheren molaren Konzentration als TEM verabfolgt wurden. Dies kann verschiedene Ursachen haben: 1. könnte die Öffnung der unstabilen dreigliedrigen heterozyklischen Ringsysteme des TEM und Diepoxybutan zusätzlich Energie für den Mutationsprozeß liefern. 2. Ist es möglich, daß auch die größere Zahl funktioneller Gruppen im Falle des TEM von Bedeutung ist. Ross (1953) nimmt an, daß dadurch die Affinität zu proliferierendem (Krebs-)Gewebe vergrößert wird. Schließlich besteht 3. noch die Möglichkeit, daß die im Vergleich zu anderen Cytostatica größere Gewebsspezifität des Mylerans dafür verantwortlich ist. Sie bietet eine gute Erklärungsmöglichkeit für die relativ niedrige Mutationsrate bei hoher, jedoch stark selektiver cytostatischer Wirksamkeit. Auch für den chemisch ähnlichen Monoester dürfte diese Annahme zutreffen.

Oft sind die einzelnen Spermatogenesestadien verschieden empfindlich gegenüber dem mutationsauslösenden Reiz physikalischer und chemischer Mutagene (Auerbach 1953, 1954a—c, 1957, Lüers 1953, Auerbach und Slizynski 1956, Batemann 1956, Fahmy und Fahmy 1956b, 1957a, b, Fritz-Niggli 1957, Kaplan und Pelc 1956). Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eine unterschiedliche Sensibilität des Spermatogenesezyklus gegenüber den verwendeten Mutagenen. Zwar können anscheinend alle Spermatogenesestadien angegriffen werden, doch deuten die geringe Mutationsgruppenbildung, deren Nichtidentität und die gegenüber der Mutationshäufigkeit in frühen Serien gesichert niedrigeren Mutationsraten in späteren Serien darauf hin, daß postmeiotische Keimzellstadien empfindlicher sind als prämeiotische Stadien. Da keine signifikanten Differenzen zwischen den Mutationshäufigkeiten innerhalb der ersten 3 Serien auftraten, sind wahrscheinlich Spermatiden und Spermatozoen gleich sensibel. Auf Grund ähnlicher Befunde kommt Vogt (1950a) zum gleichen Ergebnis für Äthylurethan. Besonders interessant ist, daß Fahmy und Fahmy (1956c) mit einer dem Di- und Monomethylsulfonsäureester des 1,4-Butandiols sehr ähnlichen Verbindung, dem Äthylmethansulfonat (alle 3 Stoffe sind Alkylsulfonate) zur gleichen Beurteilung der Empfindlichkeit des Spermatogenesezyklus kommen (vgl. auch Fahmy und Fahmy 1958).

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnene Verteilung der induzierten Mutationen über das X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* läßt sich aus den im experimentellen Teil angestellten Erwägungen am besten mit den Ergebnissen von Belitz (1957) vergleichen. Für TEM, dessen biologische Wirksamkeit nach Ross (1953) gleichfalls auf einer Carbenium-Ionen-Reaktion beruhen soll, ergaben sich in den Regionen *sc—ec* und *f*—SpA gesicherte Abweichungen gegenüber der Verteilung spontaner Mutationen über das X-Chromosom von *Drosophila*. Daraus schloß der Autor auf eine bevorzugte mutagene Wirksamkeit dieses Stoffes auf bestimmte Chromosomenabschnitte. Für die in den hier beschriebenen Experimenten geprüften Verbindungen ließ sich eine solche Spezifität nicht feststellen. Die Mutationshäufigkeit in den einzelnen Chromosomenregionen war proportional den jeweiligen Spontanraten generell erhöht. Dies mag zunächst überraschen, könnte man doch annehmen, daß Stoffe, die demselben Reaktionstyp folgen,

[1] Diese Ergebnisse sind auch an *Drosophila* gewonnen worden; bezüglich TEM sogar am gleichen Stamm mit derselben Methodik.

auch gleiche mutagene Wirkung zeigen müßten. Dies braucht jedoch keineswegs so zu sein. Im Gegenteil: Es ist nicht einmal verwunderlich, daß die durch TEM einerseits und den Di- bzw. Monomethylsulfonsäureester des 1,4-Butandiols anderseits induzierten Mutationen in verschiedener Weise über das X-Chromosom verteilt sind. Diese 3 Verbindungen unterliegen zwar in ihrer biologischen Wirkung mit großer Wahrscheinlichkeit dem gleichen Reaktionsmechanismus, gehören aber sehr differenten Stoffklassen an (TEM ist ein Triazinderivat, die letztgenannten Verbindungen sind Alkylsulfonate). Derartige Unterschiede können zu einer unterschiedlichen Affinität gegenüber den zahlreichen Angriffspunkten im DNS-Molekül und damit zu einer andersartigen Verteilung der induzierten Mutationen über ein Chromosom führen. Diese Annahme wird durch die Ausführungen von ROSS (1953) gestützt, der darauf hinweist, daß die Carbenium-Ionen-Reaktion durch die Affinität zwischen den nukleophilen Zentren in biologischen Systemen und den elektrophilen Carbenium-Ionen beeinflußt wird. Für die unterschiedliche mutagene Wirkung von TEM und „Chinon I" (Bayer) macht BELITZ (1957) ebenfalls die Zugehörigkeit zu verschiedenen Stoffklassen verantwortlich.

Von 59 geprüften Mutationen verhielten sich 58 genetisch wie Punktmutationen oder minute rearrangements. Nur eine Mutation erwies sich im Lokalisationstest als Chromosomenmutation. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren überein, die darauf hinweisen, daß der Anteil an genetisch erfaßbaren Chromosomenmutationen nach Behandlung mit chemischen Mutagenen geringer ist als nach der Anwendung ionisierender Strahlen (AUERBACH 1951, AUERBACH und ROBSON 1947b, FAHMY und BIRD 1953). Darüber hinaus scheinen Chromosomenmutationen in den vorliegenden Untersuchungen noch seltener zu sein als nach Einwirkung anderer chemischer Mutagene auf *Drosophila* (BELITZ 1957). Lediglich nach Verwendung von Urethan (VOGT 1950b — unter 73 Mutationen keine Chromosomenmutation) und Senföl (AUERBACH und ROBSON 1947a — unter 2000 Chromosomen keine größere Deletion) wurden ähnliche Werte gefunden. Der relativ geringe Anteil an Chromosomenmutationen soll nach AUERBACH (1951) auf die geringe mutationsauslösende Wirkung der betreffenden Mutagene zurückzuführen sein, da möglicherweise auch nach chemischer Behandlung große rearrangements zwei unabhängige Mutationsereignisse erfordern. BELITZ (1954) und LÜERS (1955) konnten jedoch für Miracil zeigen, daß auch weit schwächere Mutagene als die hier verwendeten in relativ hohem Maße Chromosomenmutationen bei *Drosophila* zu induzieren vermögen.

## Zusammenfassung

1. Verfütterung von 1,4-Dimethansulfonoxybutan (Myleran) löste im X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* bis zu 0,76% Mutationen aus. Eine hydrolysierte 1%ige wäßrige Myleransuspension induzierte bis zu 2,15% Mutationen. Deshalb wurden auch die relativ stabilen Spaltprodukte des Mylerans 1,4-Butandiol, Methylsulfonsäure und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester auf mutagene Wirksamkeit geprüft. 1,4-Butandiol und Methylsulfonsäure erwiesen sich als nicht mutagen. Dagegen wurden durch 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester bis zu 2,18% Mutationen induziert.

2. Die mutagene Wirkung der geprüften Substanzen ist in den ersten 15 Tagen nach Absetzen der Behandlung deutlich stärker als in dem nachfolgende Zeitraum. Dies wird dadurch erklärt, daß postmeiotische Keimzellstadien gegenüber dem mutagenen Reiz der verwendeten Stoffe empfindlicher sind als prämeiotische Stadien der Spermatogenese.

3. Die Verteilung der in den Mutagenitätsuntersuchungen induzierten Mutationen über die genetische Karte des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster* entspricht der Verteilung spontaner Mutationen.

4. Der Anteil genetisch erfaßbarer Chromosomenmutationen war in den vorliegenden Untersuchungen niedriger als nach Einwirkung anderer chemischer Mutagene, entsprach jedoch den Beobachtungen von Auerbach und Robson sowie von Vogt an Senföl bzw. Äthylurethan.

5. 1,4-Dimethansulfonoxybutan und 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester sind alkylierende Agentien, die der Carbenium-Ionen-Reaktion unterliegen. Es wird vermutet, daß dieser Reaktionstyp der betreffenden Verbindungen die mutagene Ursache ist.

## Literatur

Alexander, P.: The reactions of carcinogens with macromolecules. Advanc. Cancer Res. **2**, 1—72 (1954). — Auerbach, C.: Induction of changes in genes and chromosomes. Problems in chemical mutagenesis. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 199—213 (1951). — Sensitivity of *Drosophila* germ cells to mutagens. Heredity **6**, Suppl., 247—257 (1953). — Variations in the response of *Drosophila* germ cells to mutagens. Caryologia (Firenze) **6**, Suppl., 690 –692 (1954a). — The brood pattern of X-ray-induced rearrangements. Dros. Inf. Serv. **28**, 101 (1954b). — Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of X-rays. Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre **86**, 113 –125 (1954c). — Sensitivity of immature mouse sperm to the mutagenic effect of X-rays. Nature (Lond.) **179**, 725—727 (1957). — Auerbach, C., and H. Moser: Production of mutations by monochloro-mustards. Nature (Lond.) **166**, 1019—1020 (1950). — Auerbach, C., and J. M. Robson: Tests of chemical substances for mutagenic action. Proc. roy. Soc. Edinb. B **62**, 284—291 (1947a). — The production of mutations by chemical substances. Proc. roy. Soc. Edinb. B **62**, 271—283 (1947b). — Auerbach, C., J. M. Robson and J. G. Carr: The chemical production of mutations. Science **105**, 243—247 (1947). — Auerbach, C., and B. M. Slizynski: Sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of X-rays. Nature (Lond.) **177**, 376—377 (1956). — Badger, G. M.: Miscellaneous chemical carcinogens: chemical constitution and carcinogenic activity. Brit. J. Cancer **10**, 330—356 (1956). — Bateman, A. J.: Mutagenic sensitivity of maturing *Drosophila* sperm. I. Dominant lethals. (With two text-figures.) J. Genet. **54**, 400—410 (1956). — Belitz, H. J.: Genetische Analyse spontaner und induzierter Mutationen des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 173—184 (1954). — Vergleichende Untersuchung der Verteilung spontaner und durch Chinon I (Bayer G 4073) induzierter Mutationen über die genetische Karte des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 434—442 (1957). — Bierman, H. R., A. G. Knudson jr., K. H. Kelly and G. M. Timmis: The influence of CB-2348 (Dimethylmyleran) upon the hematopoitic system of leukemic and nonleukemic man. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **2**, 188 (1957). — Biesele, J. J., F. S. Phillips, J. B. Thiersch, J. H. Burchenal, S. M. Buckley and C. C. Stock: Chromosome alteration and tumour inhibition by nitrogen mustards: the hypothesis of cross-linking alkylation. Nature (Lond.) **166**, 112—113 (1950). — Bird, M. J.: Chemical mutagenesis. Dros. Inf. Serv. **25**, 100 (1951). — Chemical production of mutations in *Drosophila:* comparisons of techniques. J. Genet. **50**, 480—485 (1952). — Bird, M. J., and O. G. Fahmy: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. I. 1:2,3:4-diepoxybutane. Proc. roy. Soc. Edinb. B **140**, 556—578 (1953). — Bollag, W.: Myleran, ein neues Cytostaticum bei Leukämien. Schweiz. med. Wschr. **83**, 872—876 (1953a). — Der Einfluß von Myleran auf die Keimdrüsen von Ratten. Experientia (Basel) **9**, 268 (1953b). — Cytostatica in der Schwangerschaft. Schweiz. med.

Wschr. **84**, 393—400 (1954). — Burkl, W. u. G. Kellner: Der Ablauf der Follikelreifung und die postnatale Oogenese bei der Ratte, studiert mit Hilfe des Mylerans. Z. Zellforsch. **41**, 172—185 (1954). — Demerec, M., E. M. Witkin, E. L. Labrum, I. Galinsky, J. Hanson, H. Monsees and T. H. Fethersten: Bacterial genetics. Carnegie Instit. Wash. Year Book **57**, 183—233 (1952). — Fahmy, O. G., and M. J. Bird: Chromosome breaks among recessive lethals induced by chemical mutagens in *Drosophila melanogaster*. Heredity **6**, 149—159 (1953). — Fahmy, O. G., and M. J. Fahmy: Cytogenic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. V. Differential response of the alkylating mutagens and X-radiation. J. Genet. **54**, 146—164 (1956a). — Mutagenecity of 2-chloroethylmethanesulphonate in *Drosophila melanogaster*. Nature (Lond.) **177**, 996—997 (1956b). — The mutagenic action of methylsulphonates. Dros. Inf. Serv. **30**, 112—113 (1956c). — Mutagenic response to the alkyl-methanesulphonates during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Nature (Lond.) **180**, 31—34 (1957a). — Selective cell stage response to the mutagenecity of S-chloroethylcysteine in *D. melanogaster*. Dros. Inf. Serv. **31**, 118 (1957b). — Differential cell-stage response to mutagens. Proc. X. Int. Congr. Genet. Montreal, 1958. **2**, 78 (1958). — Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser u. G. Meyer: Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung der Glykole unter besonderer Berücksichtigung von 1,3-Butylenglykol. Z. ges. exp. Med. **115**, 22—39 (1949). — Fritz-Niggli, H.: Qualitative and quantitative differences in the induction of dominant lethals in Drosophila by 31-MeV X-rays, 30-MeV electrons, and 180-KeV X-rays. Dros. Inf. Serv. **31**, 171—172 (1957). — Galton, D. A. G.: Myleran in chronic myeloid leukaemia. Results of treatment. Lancet **1953 I**, 208—213. — Galton, D. A. G., and M. Till: Myleran in chronic myeloid leukaemia. Lancet **1955 I**, 425—430. — Glombitza, V. u. A. Lesser: Wirkungsänderung von 1,4-Butandiol durch Substitution zu 1,4-Dimethylsulfonoxybutan (Myleran). Klin. Wschr. **32**, 809—810 (1954). — Goldacre, R. J., A. Loveless and W. C. J. Ross: Mode of production of chromosome abnormalities by the nitrogen mustards. Nature (Lond.) **163**, 667—669 (1949). — Haddow, A.: Chemistry of cancer. Nature (Lond.) **168**, 462 –463 (1951). — Biological alkylating agents in cancer chemotherapy, with special reference to 1,4-dimethanesulphonoxybutane ("Myleran") in the treatment of chronic myelogenous leukaemia. Sonderbände zur Strahlentherapie **32**, Ergebnisse des VII. Internationalen Kongresses für Radiologie in Kopenhagen, 49 (1953a). — The chemical and genetic mechanisms of carcinogenesis. II. Biologic alkylating agents. In F. Homburger, and W. H. Fishman, The physiopathology of cancer. New York: Paul B. Hoeber, 1953b. — The biochemistry of cancer. Ann. Rev. Biochem. **24**, 689—742 (1955). — Haddow, A., and G. M. Timmis: Myleran in chronic myeloid leukaemia. 1. Chemical constitution and biological action. Lancet **1953 I**, 207—208. — Hemmerly, J., and M. N. Demerec: Investigation of diverse systems for cancer chemotherapy screening. XIII. Tests of chemicals for mutagenecity. Cancer Res. **3**, Suppl., 69—75 (1955). — Homer, R. F.: Chemical radiomimetic agents and cancer. Science **31**, 69—83 (1954). — Kanzow, U., u. H. Wolfers: Zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie mit Myleran. Medizinische **2**, 1460 bis 1461 (1957). — Kaplan, W. D., and S. R. Pelc: Autoradiographic studies of *Drosophila* gonads following the feeding of $^{14}C$ labelled formaldehyde. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 356—364 (1956). — Kirk, I., and M. Westergaard: Mutagenic activity of some mustard gas compounds. Nature (Lond.) **166**, 1020—1021 (1950). — Klages, F.: Lehrbuch der organischen Chemie. 1. Band, Systematische organische Chemie. Berlin: W. de Gruyter 1957. — Kølmark, G., and N. H. Giles: Comparative studies of monoepoxydes as inducers of reverse mutations in *Neurospora*. Genetics **40**, 890—902 (1955). — Kurrle, G. R.: Myleran. A review of its action and a report of its use in chronic myeloid leukaemia. Med. J. Aust. **42**, 636—641 (1955). — Loveless, A.: Qualitative aspects of the chemistry and biology of radiomimetic (mutagenic) substances. Nature (Lond.) **167**, 338—342 (1951). — Loveless, A., and S. Revell: New evidence on the mode of action of "mitotic poisons". Nature (Lond.) **164**, 938—944 (1949). — Loveless, A., and W. C. J. Ross: Chromosome alteration and tumour inhibition by nitrogen mustards. Hypothesis of a cross-linking alkylation. Nature (Lond.) **166**, 1112—1114 (1950). — Lüers, H.: Untersuchungen über die Mutagenität des Triäthylenmelamin (TEM) an *Drosophila melanogaster*. Arch. Geschwulstforsch. **6**, 77—83 (1953). — Biologisch-genetische Untersuchungen über die Wirkung eines Thioxanthonderivates an *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 93—96 (1955). — McKenzie, D., M. L. Stevens, W. F. Dunning and M. R. Curtis: The response

of a transplantable acute leukaemia in rats to alkylating agents. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **2**, 230 (1957). — Moutschen-Dahmen, J., et M. Moutschen-Dahmen: L'action du Myleran (Di-methanesulfonyloxy-butane) sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. Hereditas (Lund) **44**, 415—446 (1958). — Oettel, H. u. G. Wilhelm: Wege zur Chemotherapie des Krebses. Arzneimittel-Forsch. **4**, 691—703 (1954). — Paterson, E.: The chemotherapy of malignant disease. Practitioner **147**, 279—288 (1955). — Rose, F. L., J. A. Hendry and A. L. Walpole: New cytotoxic agents with tumour-inhibitory activity. Nature (Lond.) **165**, 993—996 (1950). — Ross, W. C. J.: Aryl-2-halogenalkylamines. Part III. The reactions of NN-di-2-chloroethyl-p-anisidine and β-naphtyldi-2-chloroethylamine in aqueous-acetone salt solutions. J. chem. Soc. (Lond.), 2589—2596 (1949). — Biological action of X-rays, nitrogen mustards, diepoxides and peroxides. Nature (Lond.) **165**, 808—810 (1950). Chemistry of cancer. Nature (Lond.) **168**, 462—463 (1951). — The chemistry of cytotoxic alkylating agents. Advanc. Cancer Res. **1**, 397—449 (1953). — In vitro reactions of biological alkylating agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. **68**, 669—681 (1958). — Sexton, W. A.: Chemische Konstitution und biologische Wirkung. Weinheim: Verlag Chemie 1958. — Stern, C.: A note on the detection of differential effects of mutagens. (With one text-figure). J. Genet. **55**, 276—279 (1957). — Stevens, C. S., and A. Mylroie: Mutagenic activity of beta-chloroalkyl amines and sulfides. Nature (Lond.) **166**, 1019 (1950). — Stevens, W. L.: Accuracy of mutation rates. J. Genet. **43**, 301—307 (1942). — Tanaka, T., S. Ohno, R. Kinosita and H. Bierman: Effect of Myleran on normal and malignant tissues. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **2**, 51 (1955). — Timmis, G. M., and C. A. Elson: Effect of a series of tumor-inhibiting, α, ω-bis (methylsulfonoxy)-alkanes on the blood. Congr. intern. biochim., Résumés communs., 2. Congr., Paris 1952, p. 483, 7207h. Ber. in Chem. Abstr. 7802c (1954). — Trams, E. G., R. A. Salvador, G. D. Maengwyn and V. de Quattro: Studies on the uptake, distribution and metabolic fate of 1,4-dimethanesulphonoxybutane (Myleran) in the rat. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **2**, 256 (1957). — Truhaut, R., et G. Deysson: Étude des effets, sur les mitoses des cellules végétales, du 1,4-diméthylsulfonoxybutane. Essais de protection par la β-mercaptoéthylamine. C. R. Acad. Sci (Paris) **238**, 1833—1835 (1954). — Vogt, M.: Ergänzende Befunde zur mutagenen Wirkung der Urethane (Carbaminsäureester) bei *Drosophila*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 341—346 (1950a). — Analyse durch Äthylurethan bei *Drosophila* induzierter Mutationen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 324—340 (1950b).

Dipl.-Biol. G. Röhrborn, Institut für Genetik der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Rudeloffweg 9

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 132—147 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

# PARALIPOMENA ZUR GENETIK VON *OENOTHERA*

## MUTANTEN VON *OE. HOOKERI*, REZIPROKE BASTARDE, SAMENGRÖSSE, SUBLETALE KOMBINATIONEN, ANALYSE VON *HOOKERICURVA* *

Von

O. Renner

Mit 11 Textabbildungen

*(Eingegangen am 17. Dezember 1958)*

## A. Spontane Mutationen bei *Oenothera Hookeri*

Durch Röntgenbestrahlung sind wiederholt Mutanten von *Oe. Hookeri* hervorgerufen worden. Marquardt (1943) berichtet über eine strukturelle Mutante mit einer reziproken Translokation, später (1948) über 2 Mutanten mit je 2 Translokationen. Derselbe Autor erhielt eine haploide Pflanze, aus der Oehlkers seine seit 1939 kultivierte homozygotische Linie abgeleitet hat, 1938 aus Bestäubung unbehandelter Blüten mit röntgenbestrahltem Pollen (briefliche Mitteilung). Rudloff u. Stubbe (1935) beschreiben eine größere Zahl von Genmutanten. Hyperchromosomische Individuen sind bei reiner *Oe. Hookeri* nicht bekannt geworden, auch keine tetraploiden, während durch Colchicinbehandlung die *gigas*-Form leicht zu erhalten ist. Spontane Mutation ist also bei der sehr stabilen Art, die allerdings wohl nie in großer Zahl kultiviert wurde, bis jetzt nicht beschrieben.

### *I. Oenothera Hookeri mut. pitys*

Im Jahre 1938 erwies sich eine Familie von 12 *Hookeri*-Pflanzen, die durch Selbstbestäubung einer wohl für normal gehaltenen Pflanze gewonnen war, als gar nicht typisch, ebenso eine zweite Saat im nächsten Jahr. Die zweite Generation wurde 1940 aufgezogen, die dritte 1941, neben einer von Prof. Oehlkers erhaltenen typischen Sippe, von der alles später als *Hookeri* Standard verwendete Material stammt. Die abweichende Form, die ihre Charaktere bis heute beibehalten hat, wächst langsamer als der Typus, der Hauptstengel wird etwas höher und dicker, bleibt aber unverzweigt — nur aus der Rosette erheben sich einige schwache Seitentriebe —, die Blätter sind schmäler, und am tiefsten ist der Blütenstand verändert: die unteren und mittleren Brakteen tragen zu einem größeren oder kleineren Teil keine Blüten in den Achseln, die obersten sterilen Brakteen sind am gehemmten Gipfel schopfartig zusammengedrängt; die Blüten sind normal. Abb. 1 stellt einen typischen, Abb. 2 einen ungewöhnlich gut entwickelten Gipfel dar. Abgesehen von der Krümmung der Blätter erinnert die Mutante, die *pitys* (Fichte) genannt worden ist, in ihrer Wachstumsweise an die Mutante *helix*, die bei einem *Lamarckiana*-Bastard aufgetreten ist (Renner 1953, Chrometzka 1955). Bei Kreuzung mit der Stammform (41/15) dominieren die typischen Merkmale durchaus, der Mischling hat wie die Mutante in der Meiose 7 Paare, in der $F_2$ sind Typus und Mutante scharf geschieden (42/120, 45 Pfl.). Es liegt also ein recessives Gen *pit* vor. Die *hookerilaeta* aus *Lamarckiana subcruciata* × *Hookeri pitys* ist kräftig, von normalem Wuchs. Bei Selbstung liefert

* Mit Unterstützung durch die Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

sie normale *laeta*, aber *Hookeri* als *pitys*. Daraus ist zu schließen, daß *pit* weder in 1.2 nach in 5.6 liegt. Mehr ist noch nicht bekannt, aber das Gen kann für Markierung nützlich werden.

### *II. Oe. Hookeri mut. vitrea*

Eine von $F_2$ in *Oe. (biennis cruciata* × *Hookeri) albihookeri* aufgetretene sehr großblütige normalkronige *albihookeri* brachte bei Selbstung sechs große starke

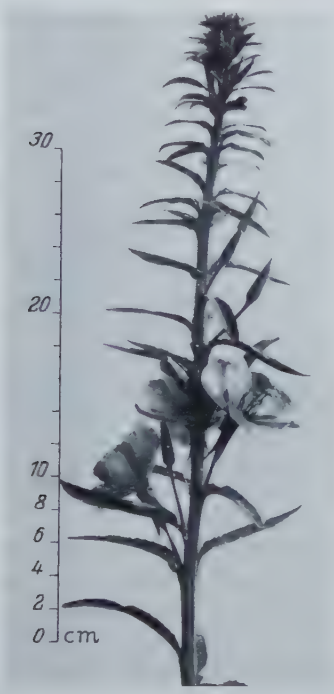



Abb. 1. *Oe. Hookeri* mut. *pitys*. 15. August 1941

Abb. 2. *Oe. Hookeri* mut. *pitys*, ungewöhnlich blütenreicher Gipfel. August 1942

*albihookeri* wie die Mutter (Krbl. 37:43 mm), sieben schmalblättrige wohl trisomische *albihookeri* (ähnlich *lonche*; vgl. R. 1948, S. 16), und etwa 50 farblose glasige Sämlinge, die sehr bald eingingen, sicher *Hookeri* (43/148).

Die nächste Generation verhielt sich ebenso; auf 12 grüne Sämlinge kamen 25 farblose, viele Samen keimten nicht, im Beet wurden 3 *albihookeri* groß wie die Mutter, 7 *albihookeri* waren wieder schmalblättrige Abweicher, 1 grüne *Hookeri* erwies sich als *pP*-Crossover (44/114). Dieselbe *albihookeri* brachte mit *biennis* ♂ München gekreuzt 51 grüne typische *hookerirubata*, 9 typische *biennis* — *albicans · rubens*, 2 *P-biennis* = *P-albicans · rubens* (Crossovers), 3 schmalblättrige Abweicher (44/115); und mit *Hookeri* Stand. gekreuzt 53 grüne *Hookeri*, 2 *grüne pP-Hookeri* (Crossovers), 7 *albihookeri* (Krbl. 41:54 mm), einige schmalblättrige Abweicher (44/116).

Eine sehr kleinblütige *pP-Hookeri* (Crossover) aus derselben $F_2$ von *albihookeri* gab bei Selbstung 4 grüne *pP-Hookeri* (Krbl. 15:17, 20:24 mm), und mehr als 50 glasige Sämlinge (43/151); *p-$^h$Hookeri* unterliegt also bei der Embryosackbildung meistens gegen *P-$^h$Hookeri*, daß *p* im Pollen fehlt, ist bekannt. Eine *pP-Hookeri* aus dieser Familie brachte bei Selbstung wieder 2 grüne *pP-Hookeri* neben 55 glasigen Sämlingen (44/112).

Die nicht lebensfähigen Keimlinge werden zweimal *P-$^{h}$Hookeri* enthalten. Da die durch Crossing-over entstandene *p P-Hookeri* grün ausfällt, muß das Letalgen in dem Chromosomenbezirk von *$^{h}$Hookeri* liegen, der *P* einschließt, also in dem Schenkel 3 von 3.4.

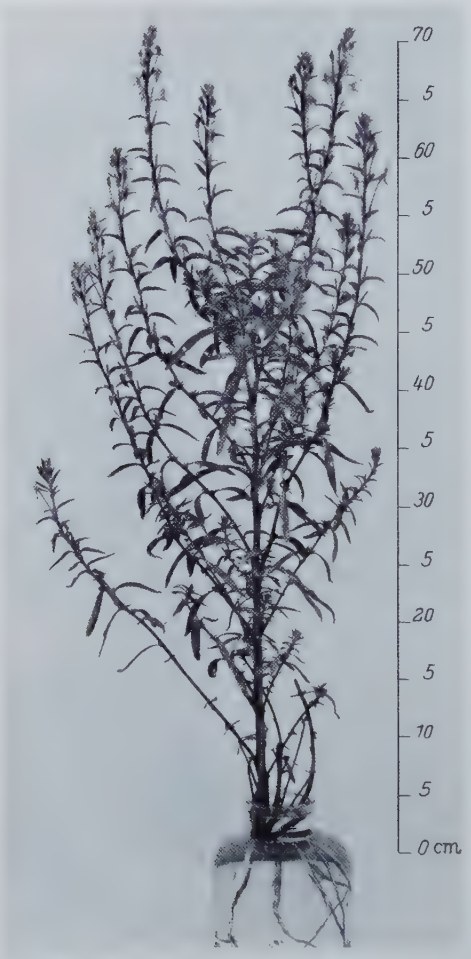



Abb. 3. *Oe. Hookeri* haploid, abgeleitet, kleinblütig, stumpfkelchig. August 1952

Als glasig sind die sterbenden Sämlinge bezeichnet und *vitrea* (Symbol *vit*) ist die Mutante genannt worden, weil der ganze Körper fast durchsichtig war. Die Kotyledonen, die sich nur eben entfalteten, ohne wesentlich größer zu werden, hatten keine Spur von Farbe, weder von Grün noch von Gelblich noch von Rot, wie die Formen mit Unverträglichkeit zwischen Zellkern und Plastiden oder mit durch Mutation defekt gewordenen Plastiden. Anatomisch sind sie leider nicht untersucht worden, aber es ist zu vermuten, daß die Plastiden ganz unentwickelt blieben, auch sehr wenig — oder überhaupt keine ? — Stärke enthielten. Vielleicht waren auch die Intercellularen kleiner als gewöhnlich. Leider ist die Form *Vit vit* 1945 verlorengegangen, und weder vorher noch nachher ist etwas Ähnliches gefunden worden.

### *III. Eine haploide Oe. Hookeri*

In der Nachkommenschaft einer kleinblütigen stumpfkelchigen *Hookeri*, wie sie aus *(Hookeri × biennis) rubata* hervorgeht, fand sich eine zierliche, aber wohlverzweigte und reich blühende Pflanze, von der vermutet wurde, daß sie haploid sei, und die auch wirklich nur 7 Chromosomen besaß. Die Harmonie des Wachstums war vollkommen (Abb. 3).

## B. Reziproke Bastarde zwischen *Oe. Hookeri* und *Oe. purpurata*

Für die reziproken Bastarde zwischen den homozygotischen Arten *Oe. Hookeri* T. et G. und *Oe. purpurata* Klebahn hat Rudloff (1929) Unterschiede in der Blütengröße angegeben. Er fand die Kronblattbreite, nach Messungen an je 100 Petalen, bei $H \times p$ zu 20:22 mm, bei $p \times H$ zu 24:26 mm. Auffällig ist dabei, daß die Blüten kleiner sein sollen, wenn die großblütige *Oe. Hookeri* Mutter ist. Ich habe die beiden Bastarde zweimal geprüft und, ohne eine größere Zahl von Messungen auszuführen, keine Unterschiede finden können. Von *Oe. purpurata*

kultiviere ich seit 1928 denselben Stamm, das Original von Klebahn. Die *Oe. Hookeri* von 1944 gehört einem anderen Stamm an als die von Rudloff verwendete (vgl. oben, S. 132). Mein Ergebnis stellt die Tabelle 1 dar; das Verhalten der Kreuzungen mit *Oe. franciscana* Bartlett, die der *Oe. Hookeri* sehr ähnlich ist (vgl. Hoeppener u. Renner 1929, S. 55ff.), wird angeschlossen.

Zu gleicher Zeit und im gleichen Zustand gemessen, zeigen die reziproken Bastarde also gleiche Größe der Petalen, aber im September sind die Blüten beider Reziproken etwas kleiner als gegen Ende August in der Hochblüte. Die *franciscana*-Mischlinge, die nur im August gemessen wurden, verhalten sich nicht anders. Auch sonst sind mir bei *Oenothera*-Bastarden nie Reziprokenunterschiede aufgefallen.

Tabelle 1

| Verbindung | Zeit | Kronblatt Länge : Breite in mm | Knospenlänge in mm |
|---|---|---|---|
| (*Hook.* × *purp.*) | 27. 8. 44 | 22:27—25:30 | |
| | September 1944 | 21:24 | |
| (*purp.* × *Hook.*) | 27. 8. 44 | 22:26—24:28 | |
| | September 1944 | 21:23 | |
| (*Hook.* × *purp.*) | September 1952 | 18:22 | |
| (*purp.* × *Hook.*) | September 1952 | 19:23 | |
| (*franc.* × *purp.*) | August 1944 | 21:27—22:28 | 76—80 |
| (*purp.* × *franc.*) | August 1944 | 21:26,5—23:28 | 78—80 |

Rudloff hat seine Abb. 4 auf *einer* Platte, also beide Bastarde am selben Tag, aufgenommen. Aber bei *Oe. (purpurata* × *Hookeri)* erscheinen die beiden ersten Blüten des Hauptgipfels, die oft besonders groß sind, eben aufgeblüht, bei *Oe. (Hookeri* × *purpurata)* stehen unter zwei entfalteten Blüten schon drei Früchte. Wenn alle Messungen an dem Tag der Aufnahme ausgeführt waren, könnte das von mir nicht bestätigte Ergebnis durch den wenn auch geringen Altersunterschied der Inflorescenzen verursacht gewesen sein.

### C. Die Größe der Samen von *Oe. Hookeri* und *Oe. albihookeri*

Die Nachkommenschaften selbstbestäubter *Oe. (biennis* × *Hookeri) albihookeri* bestehen immer größtenteils aus *Hookeri* (groß- und kleinblütig), weil *albicans* aus den Embryosäcken „verdrängt" wird. Als Crossovers kommen in geringer Zahl *P P-albata* = *P-albicans* · *P-*$^{h}$*Hookeri* und *p P-Hookeri* = *p-*$^{h}$*Hookeri* · *P-*$^{h}$*Hookeri* vor, die einander recht ähnlich sehen, insofern sie weniger Anthokyan führen als normale *Hookeri*, aber mehr als normale *albihookeri*. Als wichtiges Unterscheidungsmerkmal hat sich die Samengröße erwiesen. Die Samen normaler *Hookeri*, aus *albihookeri* hervorgegangener *P P-Hookeri* und der seltenen *p P-Hookeri* sind beträchtlich kleiner als die von *p P-* und *P P-albihookeri*.

Daß *albihookeri* lauter große Samen bildet, ist deshalb bemerkenswert, weil diese Samen zum größten Teil *Hookeri*-Embryonen einschließen. Am wichtigsten ist es natürlich, die Größe der Embryonen selber zu bestimmen, wie mein früh verstorbener Schüler Krumbholz (1930) getan hat. Er findet für die Länge des Embryo, um nur dieses Maß wiederzugeben, folgende Werte:

| *biennis* | *Hookeri* | *(biennis* × *Hookeri) albata* | *(Hookeri* × *biennis) rubata* |
|---|---|---|---|
| 1500 ± 31 $\mu$ | 940 ± 8,5 $\mu$ | 1320 ± 20 $\mu$ | 870 ± 14 $\mu$ |

Die Embryonen der *Oe. biennis* sind also beträchtlich größer als die der *Oe. Hookeri*, und die Embryonen der reziproken Bastarde kommen nahe an die der Mutterart heran. Das heißt, daß die *Hookeri*-Embryonen aus *albihookeri* größer sind als die aus *Hookeri*.

In einer späteren Versuchsreihe mit *Oe. Hookeri* und ihren Nachkommen aus der Kreuzung mit *Oe. biennis* als Mutter wurden die Samen aus je 6 unteren Früchten nach freier Bestäubung gezählt und gewogen; die sehr ähnliche *Oe. franciscana* (Rasse von Davis) wurde angeschlossen[1]. Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 2

| | Früchte | Samen | Samen je Frucht | Samengewicht in g | Gewicht 100 Samen in mg |
|---|---|---|---|---|---|
| *Hookeri* | 5 | 3706 | 741 | 0,86955 | 23,4 |
| *albihookeri* | 6 | 2223 | 370 | 1,15905 | 52,1 |
| $F_2$ *Hook.* grbl. | 6 | 4086 | 681 | 0,86317 | 21,2 |
| $F_2$ *Hook.* klbl. | 6 | 4219 | 703 | 0,95457 | 22,6 |
| $F_2$ *p P-Hookeri* | 6 | 3013 | 502 | 0,75037 | 24,9 |
| $F_2$ *P P-albihookeri* | 5 | 2170 | 434 | 0,94657 | 43,5 |
| *franciscana* | 6 | 2752 | 459 | 0,79675 | 28,9 |
| *albifranciscana* | 6 | 2104 | 351 | 1,09623 | 52,1 |

Die Samen der *albihookeri* sind, obwohl sie größtenteils *Hookeri*-Embryonen enthalten, doppelt so schwer wie die der *Hookeri*, und das Verhältnis zwischen *franciscana* und ihrer *albata* ist ungefähr das gleiche. Zu einem Teil wird der Unterschied zwischen Art und Bastard auf die ganz von der Mutter gelieferte Samenschale fallen. Die aus *albihookeri* nach Selbstbestäubung herausgespaltenen *Hookeri*-Typen haben gleiches Hundertkorngewicht wie die Vaterart. Ob der Unterschied zwischen normaler und *P P-albihookeri* (52,1 gegen 43,5 mg) konstant ist, müßte an größerem Material, als es 6 Früchte einer Pflanze sind, geprüft werden.

Tabelle 3

| Samen je Frucht | Gewicht 100 Samen in mg | Samen je Frucht | Gewicht 100 Samen in mg |
|---|---|---|---|
| *Hookeri* | | *albihookeri* | |
| 793 | 22,2 | 416 | 49,3 |
| 759 | 22,4 | 413 | 49,4 |
| 752 | 23,9 | 391 | 53,0 |
| 704 | 24,2 | 355 | 51,3 |
| 698 | 24,8 | 330 | 55.1 |
| 432 | 29,5 | 318 | 56,5 |

Daß das Gewicht eines Samens um so größer ist je kleiner die Zahl der Samen in der Frucht, entspricht den allgemeinen Erfahrungen. Dafür nur 2 Beispiele (Tabelle 3).

Die kleinste Frucht der *Oe. Hookeri* ist, weil aus der Reihe fallend, in der Tabelle 2 nicht mitgerechnet, aber für die zuletzt erörterte Frage ist sie von Interesse. Das gleiche gilt für *P P-albihookeri*. Fünf Früchte hatten sehr ähnliche Samenzahlen: 447, 440, 435, 433, 415, und die Hundertkorngewichte waren 41,8, 43,5, 44,6, 42,6, 45,8 mg. Eine 6. Frucht hatte nur 264 Samen, und hier wogen 100 Samen 49,4 mg.

Bemerkenswert ist, daß die aus den großen Samen der *albihookeri* hervorgehenden *Hookeri*-Pflanzen sich von denen der normalen *Hookeri* in der Entwicklung nicht zu unterscheiden scheinen. Die *albihookeri* ist stärker, fast luxurierend.

### D. Über semiletale *flavens*·*flavens*-Kombinationen

Der Komplex *flavens* der *Oenothera suaveolens* (= *albicans* · *flavens*) von Fontainebleau bildet bei Selbstung der Rasse viele *flavens*-Homozygoten in Form tauber Samen. Das einzige letale Element von *flavens* sitzt in dem Chromosom 5·6, es wird gelegentlich durch Crossing-

[1] Die Pflanzen und die Früchte habe ich ausgewählt, die Zählungen und Wägungen hat Frl. E. Peitscher ausgeführt.

over abgetrennt, und *let-flavens · Let-flavens* tritt als gelbgrüne „Mutante" in Erscheinung, die DE VRIES *lutescens* genannt hat (vgl. z. B. R. 1941, S. 229ff.).

Eine reichere Quelle für die Gewinnung von *lutescens* ist die Verbindung von *flavens* mit *rubens* von *Oe. biennis*. Die Kombinationen *flavens · rubens* aus *Oe. suaveolens* × *biennis* und *rubens · flavens* aus *biennis* München × *suaveolens* sind mit den Plasmen beider Elterarten gelbgrün und deswegen schwach, dagegen sattgrün und kräftig mit den Plasmen — sogar schon mit den Plastiden — von *Oe. syrticola* und *atrovirens*. Die Komplexe *flavens* und *rubens* haben nur das Chromosom 5 · 6 gemeinsam, das in *rubens* den Stumpfkelchfaktor *sp*, in *flavens* den dominanten Spitzkelchfaktor *Sp* und das letale Gen *let* enthält. Aus *rubiflava* und *flavirubata* spalten deshalb bei Selbstung *flavens*-Homozygoten, die nach DE VRIES und OEHLKERS (1923) *lutescens* heißen, auch wenn sie schön grün sind, als *Sp sp* und *sp sp* heraus.

In der Verbindung *flavens · flectens*, die mit dem Plasma von *Oe. suaveolens* ganz farblos und lebensunfähig, mit dem des Vaters *Oe. atrovirens* grün und kräftig ist, können aus *flectens* in *flavens* eingeführt werden (R. 1933, 1942): 1. mit dem Chromosom 2·3 der Simplexfaktor *M*, der rotrandiges (marginates) Blatt bedingt; 2. mit dem Chromosom 1·4 der Simplexfaktor *Fl*, der das Nicken der *flexa*-Gipfel verursacht; 3. mit dem Duplett [11·13 + 12·14] der Duplexfaktor *lor*, der die Blätter verschmälert (*loreus* = riemenförmig). *M* kann ebenso aus *currans* von *Oe. syrticola* in *flavens* übernommen werden, und eine solche *M-flavirubata* ist viel verwendet worden (vgl. R. 1925, S. 26). Die beiden *M*-Allele sind wohl nicht ganz identisch, aber eine Differenzierung wurde nicht versucht. Alle 3 Faktoren bleiben in *rubiflava* und *flavirubata* an *flavens* gebunden, durch Selbstung der *rubatae* gewonnene *lutescens* ist deshalb gegebenenfalls in *M* bzw. *Fl* bzw. *lor* homozygotisch. Mit den *M M*-Formen brauchen wir uns nicht weiter zu beschäftigen; sie sind oft etwas weniger wüchsig als *m M*, aber gut lebensfähig. Dagegen sind *lor lor* und noch mehr *Fl Fl* in verschiedenen Komplexverbindungen als subletal bekannt, und es verlohnte sich zu prüfen, ob die Komplexhomozygote *lutescens* noch stärker geschädigt wird. Das ist tatsächlich der Fall.

Zur Prüfung wurden vorzugsweise *flavirubata*-Typen verwendet, deren *rubens* von *Oe. biennis cruciata* stammt und deswegen in den Embryosäcken sehr selten aktiv wird; eine gewöhnliche *biennis* täte den gleichen Dienst, aber unbequemer wäre die *biennis* München. Auf diese Weise wird erreicht, daß bei Selbstung der *flavirubata rubens*-Homozygoten als taube Samen so gut wie ganz fehlen.

### *I. lor fl-flavirubata und lor lor fl fl-lutescens*

Herkunft. *Oe. atrovirens · suaveolens: pictiflava*; *pictiflava* × *atrovirens: flaviflexa*; *flaviflexa* × *atrovirens:* u. a. *M M Lor lor-flaviflexa*; diese × *biennis cruciata: M-flavirubata, Lor* und *lor, fl* und *Fl*. — Vgl. R. 1937, Nr. 863, 1937, Nr. 949, 1942, Nr. 1533, 1942, Nr. 1560. *M lor fl-flavirubata* wurde geselbstet, und auf dem gleichen Weg wurden noch weitere 4 Generationen erzogen; im ganzen waren es 10 Familien (1928—1933).

Die *lor fl M-flavirubata* ist immer kräftig und blüht reich (Abb. 4 und 5). Die bei Selbstung abgespaltene *lor lor fl fl M M-lutescens* ist sehr schwach, sehr schmalblättrig, sehr dünnstenglig, so daß sie leicht umfällt, wird höchstens 30 cm hoch, ist aber meist viel niedriger, blüht nicht oder spät und sehr spärlich (Abb. 6); manche Sämlinge sterben früh, nach der Zahl der nicht keimenden Samen zu urteilen, keimt sie oft gar nicht. Die Zusammensetzung der aus Selbstung gewonnenen Familien war folgende:

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *flavirubata* . . . . . | 61 | 48 | 50 | 33 | 65 | 5 | 51 | 4 | 24 | 38 |
| *lutescens* . . . . . | 0 | 3 | 15 | 0 | 12 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| nicht gekeimte Samen | 65 | ? | 45 | 45 | 20 | 50 | 60 | 70 | 75 | ? |

Aus *biennis* × *M lor-flavirubata* ist *M lor-albiflava* zu gewinnen. Die Kreuzung *lor-flavirubata* × *lor-albiflava* sollte *lor lor-lutescens* liefern. Es entstanden aber in 2 Familien nur nichtkeimende Samen (30/262 und 32/226, 50 bzw. 80 Samen ausgelegt). Dieselbe *flavirubata* mit *M lor sp-rubiflava* gekreuzt brachte grüne, hohe, reich blühende *M M lor Lor-lutescens* (31/261). Es ist also der Besitz

von *lor lor*, der in den beiden anderen Kreuzungen die *lutescens* keimungsunfähig machte.

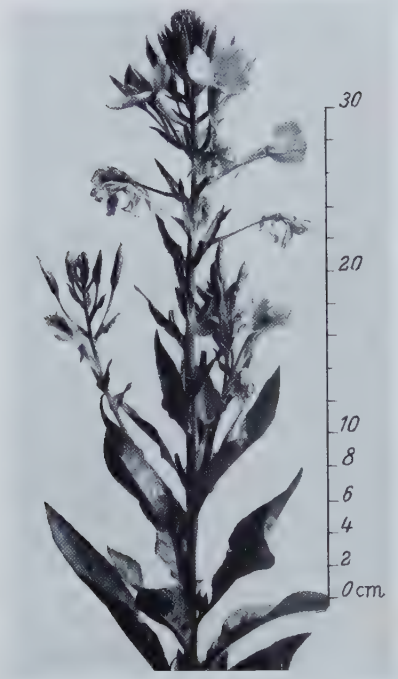



Abb. 4. *Oe. lor Sp—flavirubata.* 30/242. 10. August 1930

Abb. 5. *Oe. lor sp—flavirubata.* 30/242. 10. August 1930

Abb. 6. *Oe. lor lor—lutescens*, aus dem Beet in den Topf gesetzt. 30/242. 10. August 1930

*Flaviflexa* und *velutiflava* sind als *lor lor* zwar recht schwach, schmalblättrig, dünnstenglig, werden aber bei guter Pflege oft blühbar (Fig. 5 und 6 bei R. 1933; Fig. 24 und 25 bei R. 1943). Die *lor lor-lutescens* bringt es im besten Fall zu Krüppeln, wie Abb. 6 zeigt, und oft ist sie noch elender.

### *II. Fl Lor-flavirubata*

Die breitblättrige *Fl-flavirubata* kann kräftig nicken (ähnlich wie *Fl lor* bei R. 1942, Abb. 12). Bei Selbstung spaltet die *Sp sp*-Form natürlich stumpfkelchige *flavirubata* ab, und aus *Sp sp*- wie aus *sp sp-flavirubata* sollte bei Selbstung *Fl Fl-lutescens* hervorgehen. Sie erscheint auch manchmal in Form sehr schwacher, blaßgrüner, lichtempfindlicher Rosetten, die es im besten Fall zur Bildung 4 cm hoher Stengelchen brachten. In den meisten Familien blieb die *lutescens* aus, weil die Samen nicht keimten.

Herkunft. a) *atrovirens* × *suaveolens: flexiflava* metaklin; vgl. R. 1937, Nr. 863. Diese *flexiflava* × *biennis cruciata: flavirubata*; vgl. R. 1942, Nr. 1523. — b) Aus *flaviflexa* × *biennis*

*cruciata*, wie *lor fl-flavirubata*, oben S. 137. Die Zusammensetzung der Familien aus Selbstung war wie folgt:

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Fl-flavirubata* . . . . | 70 | 53 | 51 | 65 | 102 | 87 | 80 | 42 |
| *Fl Fl-lutescens* . . . | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 |
| nicht gekeimte Samen | 20 | 30 | 30 | 60 | 60 | ? | 40 | 70 |

Die Kreuzung *biennis* × *flavirubata* zeigt, daß *Fl-flavens* im Pollen bald ungefähr so häufig ist wie *rubens*, bald viel weniger häufig (25 *biennis*, 22 *Fl-albiflava*, 28/180; 23 *biennis*, 10 *Fl-albiflava*, 28/138; 50 *biennis*, 3 *Fl-albiflava*, 30 222). Die *Fl-albiflava* muß nach *Fl-fl* spalten, weil sie das Chromosom 1·4 doppelt besitzt.

Zwei auf etwas anderem Weg gewonnene *Fl-albiflavae* (vgl. R. 1942, Nr. 1541 und R. 1943, Nr. 2174) hatten nur aktiven *Fl-flavens*-Pollen. Denn die Kreuzung *Fl-flavirubata* × *Fl-albiflava* brachte in einem Fall nur *Fl Fl-lutescens*, 60 sehr schwache Rosetten mit kleinen kurzen Blättern (28/184), im andern Fall 4 grüne *Fl-rubiflava* und 67 *Fl Fl-lutescens*, sehr schwach, einige mit bis zu 20 cm hohen dünnen, von unten her sich entblätternden Stengeln, bis zum 20. August alle eingegangen (32/361).

### *III. lor Fl-flavirubata*

Wenn die *flavirubata* die beiden subletalen Faktoren *lor* und *Fl* (in einfacher Dosis) besitzt, ist sie durchaus gesund und nickt stark, was immer ein Zeichen guten Wachstums ist (R. 1942, Abb. 11); die Blätter sind etwas schmäler als bei der *Lor Fl*-Form. Bei Selbstung reproduziert sie sich fast ohne Abspaltung von *lor lor Fl Fl-lutescens*, und wenn diese einmal zur Keimung kommt, ist sie noch zarter als die *lor fl*- und die *Lor Fl*-Form, sehr kurzlebig, ebenso wenn sie aus der Kreuzung *lor Fl-flavirubata* × *lor Fl-albiflava* hervorgeht. *Flaviflexa* und *velutiflexa* keimen als *lor lor Fl Fl* gut, sterben aber als wenige Millimeter große, braun angelaufene Rosetten (R. 1933, Fig. 3 und 10).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *lor Fl-flavirubata* selbst: *flavirubata* . . . | 3 | 55 | 20 | |
| *lor lor Fl Fl-lutescens* | 0 | 0 | 2 | |
| *lor Fl-flavirubata* × *lor Fl-albiflava: rubens* · *lor Fl-flavens* | | | | 49 |
| *lor lor Fl Fl-lutescens* | | | | 4 |

### *IV. Die Nachkommenschaften der Fl-lutescens*

Kräftige *Fl fl Lor Lor-lutescens* ist gewonnen als seltener *let Let*-Crossover aus *flaviflexa* × *suaveolens*, z. B. aus *M M Lor Lor flaviflexa* × *suaveolens:* 1 *Fl-lutescens* neben 90 tauben Samen, 29/171. In größerer Zahl ist sie auf verschiedenen Wegen hergestellt worden. *Sp-flaviflexa* × *sp-suaveolens:* 45 *Sp sp-lutescens, fl* und *Fl*; vgl. R. 1942, Nr. 1540.

*sp-flaviflexa* × *suaveolens:* 46 *sp Sp-lutescens, fl* und *Fl*; vgl. R. 1942, Nr. 1593.

*fl-flavirubata* × *Fl-albiflava:* 56 *lutescens, Fl* und *fl*; 28/194.

*Fl-flavirubata* × *suaveolens:* 94 *Fl-lutescens*, 2 *rubiflava*, 29/182.

Die *Fl fl-lutescens* (Abb. 7) ist nicht schwächer als die gewöhnliche aufrechte Form. Bei Selbstung entstehen neben grüner *Fl fl* und *fl fl* auch immer sehr schwache, blasse, gegen helles Licht empfindliche Sämlinge, augenscheinlich *Fl Fl*, meist als kleine Rosetten sterbend, ausnahmsweise dünne, unverzweigte, höchstens 20 cm hohe Stengel treibend, die sich von unten her entblättern. Ein paar Stengel kamen zum Blühen, hier fielen an gebeutelten Inflorescenzen auch die Brakteen ab. Sie nickten gar nicht, aber der Pollen brachte mit *Oe. biennis* und *Lamarckiana* als Müttern nickende Nachkommenschaft. Die besten Familien aus Selbstung:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Fl fl- und fl fl-lutescens* | 17 | 37 | 29 | 34 | 48 |
| *Fl Fl-lutescens* . . . | 4 | 28 | 5 | 7 | 7 |

In der komplexhomozygotischen *lutescens* sind die subletalen Wirkungen der Faktoren *lor* und *Fl* gegenüber *flaviflexa* und *velutiflexa* noch verstärkt. Als *lor lor* ist *lutescens* sehr schwach und krüppelhaft, als *Fl Fl* selten noch eben lebensfähig, als *lor lor Fl Fl* lebt sie kaum 2 Wochen lang. Oft scheint bei *lor lor* und *Fl Fl* die Keimung der Samen auszubleiben.

### *V. Die Fl Fl-Typen im allgemeinen*

Das gleichartige, höchst charakteristische Bild, das alle *Fl Fl*-Kombinationen bieten, ist bemerkenswert. Die Rosetten der Sämlinge sind klein (vgl. *albiflava* in R. 1933, Fig. 7), die Blätter blaß, oft rötlich-bräunlich überlaufen, werden durch helles Licht verbrannt, vertragen deshalb oft das Freiland nicht (vgl. *albiflexa* in R. 1933, Fig. 8, ungewöhnlich kräftig). Wenn Stengel gebildet werden, sind sie sehr dünn, blaß, unverzweigt, wachsen so langsam, daß sie trotz dem Besitz von *Fl Fl* gar nicht nicken, und werfen die kleinen Blätter bald nach der Entfaltung ab, so daß immer nur ein kleiner Blattschopf einen kahlen Schaft krönt (Abb. 8, *flaviflexa*; *velflexilaeta* bei R. 1942, Abb. 11, die kräftigste aller beobachteten Formen).

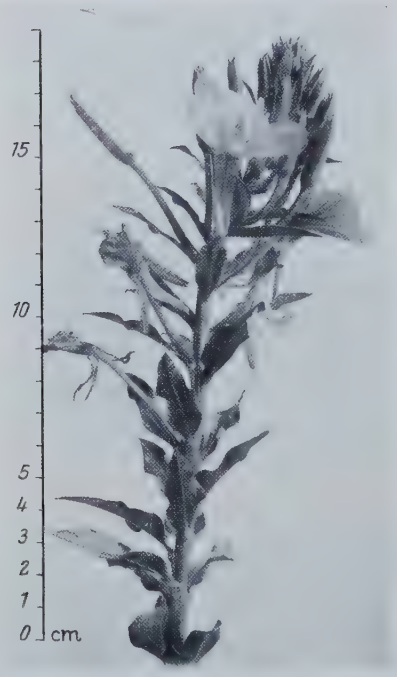



Abb. 7. *Oe. Fl fl sp sp M M—lutescens.* 29/176

Man möchte meinen, daß hier irgendein Elementarprozeß gestört ist, der vielleicht einmal biochemisch erfaßt werden kann, ähnlich wie für die Wachstumsstörungen der Genmutante *helix* eine übermäßige Produktion von Wuchsstoff verantwortlich gemacht worden ist (R. 1953; Chrometzka 1955, 1958). Die bräunliche Färbung besonders der wenige Millimeter großen Rosetten von *lor lor Fl Fl-flaviflexa* und *-velutiflexa* (vgl. R. 1942, Nr. 1521 und 1522; R. 1943, Nr. 2357) läßt an anomale Oxydationsvorgänge denken.

### E. Die Verbindungen *$^h$Hookeri . curvans* bzw. *curvans . $^h$Hookeri*

Der primäre Bastard *Oe. (Hookeri × syrticola) hookericurva* ist blaß gelb und kommt über die Entfaltung der Kotyledonen nicht hinaus; grünscheckige Sämlinge sind sehr selten, weil die Plastiden der *Oe. Hookeri* denen der *Oe. syrticola* in der Konkurrenz weit überlegen sind. Grün und gesund ist die Verbindung, wenn sie Plastiden von *Oe. syrticola* besitzt, wie als metakliner Bastard *Oe. (syrticola × Hookeri) curvihookeri*, und ebenso wenn sie auf dem Weg geeigneter Kreuzungen mit Plastiden von *Oe. atrovirens* oder *biennis* oder *Lamarckiana* oder *suaveolens* ausgestattet wird (Bild bei R. 1925, Fig. 46). Eine reiche Spaltung wurde an der Nachkommenschaft einer Linie beobachtet, die das Plasma von *Oe. Lamarckiana* besaß (R. 1925, S. 111—116). Später, als Bastarde mit *syrticola*-Plasma ver-

wendet wurden, unterblieb die zu erwartende Abspaltung von *Hookeri* bei Selbstung. Zuletzt wurde eine Form analysiert, deren Plasma von *Oe. atrovirens* (nicht wie 1936, S. 269, versehentlich angegeben, von *Oe. syrticola*) stammte.

### *I. Curvihookeri mit atrovirens-Plasma*

Die Kreuzungsfolge war: *Oe.* [(*atrovirens* × *biennis* München) *flexirubata* × *syrticola*] *rubicurva* × *Hookeri*. Beim letzten Schritt entstanden 6 *curvihookeri* neben 74 *rubihookeri*. Die Rekombinationsvorgänge in den Nachkommenschaften dieser *curvihookeri* wurden schon früher (R. 1936, S. 268—272) richtig gedeutet, weil bekannt war (durch CLELAND 1932; Bestätigung an eigenem Material), daß die *curvihookeri* in der Meiose einen Ring von 8 und einen von 6 Gliedern bildet. Die Chromosomenformel ist:

$$\begin{matrix} {}^{h}Hookeri: & (1.2 & 3P4 & 6Sp5 & 13.14 \\ curvans: & & 2M3 & 4.6 & 5.13) \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} {}^{h}Hookeri: & (7.8 & 9.10 & 12.11 \\ curvans: & & 8.9 & 10.12 & 11.7) \end{matrix}$$

Die Spaltung muß, von Crossovers abgesehen, wie bei einer Dihybride ausfallen, weil ein Triplexfaktor mit den Enden 7—12 ausgetauscht wird, und die Zahl der wirklich auftretenden Kombinationen wird dadurch vermindert, daß der Quadruplexfaktor aus *curvans*, der *Cu* enthält, homozygotisch nicht verwirklicht werden kann, und daß auch Typen, die den Triplexfaktor von *curvans* doppelt enthalten, fast nicht lebensfähig sind. Trifaktoriell wird die Spaltung dadurch, daß die Hauptgene für Blütengröße, *Co-co*, frei ausgetauscht werden, obwohl der Austausch durch Crossing-over zustande kommt.

Abb. 8. *Oe. Fl Fl Lor lor—flaviflexa*, im Topf erzogen. 30/160

Bei Selbstung der *curvihookeri* entstehen: a) *Hookeri* normal, nicht marginat, in der Meiose mit 7 Paaren ($h_7h_7$). b) *Hookeri* nicht marginat, schlanker als die normale (Abb. 9 und 10), etwas heller grün, feiner behaart, mit schmaleren, entfernteren Blättern und Brakteen, spreizenden Kelchzipfelspitzen, in manchen Jahren selektiv geschädigt durch minierende Insekten, in der Meiose mit 6, $4 \times 2$, also im wesentlichen von *Hookeri*-Konstitution, aber mit einem Triplett von *curvans* ($h_4h_4h_3c_3$). c) Normale *M-hookericurva* ($h_4c_4h_3c_3$), aus *Hookeri*-Eizellen und *curvans*-Pollen, ist in geringer Zahl zu erwarten, zytologisch ist sie nicht festgestellt. d) Abgeänderte *M-hookericurva*, mit etwas breiteren Blättern, buschigem Wuchs, nichtspreizenden Kelchzipfelspitzen, in der Meiose mit 8, $3 \times 2$, also eine *hookericurva*, die das Triplett von *hHookeri* doppelt enthält ($h_4c_4h_3h_3$); sie ist nicht häufig, weil *curvans* in der Pollenschlauchkonkurrenz untüchtig ist und in den Embryosäcken fast fehlt.

Die Zusammensetzung der im Jahr 1935 aufgezogenen Familien ist in Hinsicht auf die Laubfärbung schon mitgeteilt (1936, S. 271). Von den Früchten, die die Familien 35/204,

207, 211 geliefert hatten, wurden je ein zweitesmal Samen ausgesät, mit dem gleichen Ergebnis.

*hookericurva* (aus 34/83) selbst: 56 *m-Hookeri*, davon 28 normal, 28 schlank (Krbl. 33:36, 27:33, 23:28, 23:27 mm); 4 *M-hookericurva*, davon an 2 Pfl. die Meiose untersucht, zeigen 8, $3 \times 2$; 36/47.

*hookericurva* (aus 34/83) $\times$ *Hookeri:* 26 *m-Hookeri*, davon 14 normal, 12 schlank, 1 stark nickend, *Cu*-Crossover (vgl. unten, S. 143); 1 *M-curva* sehr großblütig; 36/48.

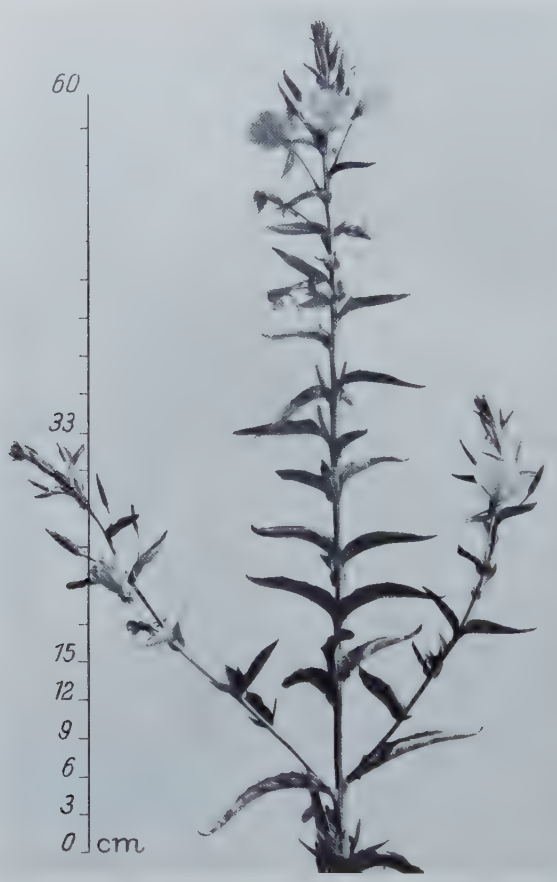



Abb. 9. *Oe. Div div—Hookeri.* 43/96. 6. August 1943

*Hookeri* $\times$ *hookericurva* (aus 34/83): 81 *Hookeri*, davon 54 normal, 27 schlank (Krbl. 40:49, 39:49, 29:32, 27:33, 25:27, 21:24 mm), 27 schlank (Krbl. 38:44, 21:26, 21:25, 21:24 mm), bei einer Pflanze die Meiose zu 6, $4 \times 2$ bestimmt; 2 *M-curva*, kräftig, buschig (Krbl. 34:37, 33:36 mm), bei beiden Pflanzen 8, $3 \times 2$ festgestellt; 36/49.

Die Analogie mit dem Verhalten der *flavicurva* (R. 1925, S. 5—22) ist fast vollkommen, wie sich bei der Ähnlichkeit der Chromosomenformeln versteht.

$$\begin{matrix} \textit{flavens:} \\ \textit{curvans:} \end{matrix} \left( \begin{matrix} 1 \cdot 4 & 6 \cdot 5 & 13 \cdot 14 \\ 4 \cdot 6 & 5 \cdot 13 & 14 \cdot 1 \end{matrix} \right) \left( \begin{matrix} 7 \cdot 8 & 9 \cdot 10 & 12 \cdot 11 \\ 8 \cdot 9 & 10 \cdot 12 & 11 \cdot 7 \end{matrix} \right) \left( \begin{matrix} 2m3 \\ 2M3 \end{matrix} \right)$$

In *flavicurva* wird ein Element von *curvans*, das spreizenden, *divaricaten* Kelch *(Div)* und schmales Blatt (*b*) vererbt, getauscht gegen nicht spreizenden Kelch (*div*) und breites Blatt (*B*) von *flavens*; da *B* in 7·8 liegt, ist der zweite

6er-Ring der Formel bei dem Austausch im Spiel. Die Allele *M—m*, in der *flavicurva* beweglich, sind in der *hookericurva* in dem 8er-Ring festgelegt. Wenn früher (R. 1925, S. 112) für nicht wahrscheinlich gehalten wurde, daß *Div* mit dem Spreizkelchfaktor der *hookericurva* identisch sei (dieser wurde deshalb mit *Spr* bezeichnet), so ist das jetzt aufzugeben.

*Hookeri schlank spreizkelchig.* Die schlanke *div Div-Hookeri* ($h_4h_4h_3c_3$) lieferte bei Selbstung entweder nur grüne *Hookeri*, mehr normal als schlank (57 Pfl., 37/46; 50 Pfl., 43/96; 56 Pfl., 31 *div*, 23 *Div*, 44/102); *Div* in der Diakinese mit 6, $4 \times 2$; oder daneben einen sehr schwachen gelbgrünen Typus, wohl *Div Div* (80 grüne, 16 früh sterbende gelbe, 37/42; über 100 grüne, 10 kleine blasse, schmalblättrige nicht blühende Rosetten, 38/48). Die *Div Div-Hookeri* müßte (als $h_4h_4$ $c_3c_3$) in der Meiose 7 Paare bilden, wenn sie blühbar würde. *Hookeri* schlank großblütig brachte mit *suaveolens* ♂ gekreuzt *hookeriflava* teils normal teils schlank (66 Pfl., 37/46), die Kombination *Div-Hookeri* ist also in den Embryosäcken gut vertreten, obwohl sie 3 Chromosomen aus dem dezidierten Pollenkomplex *curvans* besitzt.

Abb. 10. *Oe. Div div—Hookeri.* 43/96. 5. August 1943

*Div-Hookeri* × *syrticola* brachte wenige gelbgrüne Sämlinge, die bald eingingen; sie enthielten sicher *div-$^h$Hookeri,Div Div-curva* kam wohl nicht zur Keimung. Aus *biennis* München × *Div -Hookeri* kleinblütig gingen 85 grüne Pflanzen hervor, *albihookeri* und *rubihookeri*, beide teils normal teils schlank (37/44); *Div-rubihookeri* hat wie die normale 10, 2, 2 (Paare 1.2 und 5·6), *Div-albihookeri* ebenso (Paare 8·9 und 10·12), während die gewöhnliche *albihookeri* einen 14er-Ring bildet. Selbstbestäubte *albihookeri* schlank (aus 37/44) brachte 4 grüne *albihookeri* und 21 sehr schmalblättrige nicht blühende Rosetten, *Div Div-Hookeri* (38/52). *Hookeri* Stand. × *Div-Hookeri* kleinblütig (aus 36/49) brachte 196 *Hookeri*, mehr normal als schlank (37/45). Aus der Verbindung *Div-albihookeri* × *suaveolens* gingen wie zu erwarten hervor *albiflava* (6 Stück) und schlanke hohe *hookeriflava* (54 Pfl., 38/54). Die Kreuzung *Div-albihookeri* × *syrticola* lieferte 2 typische *albihookeri*, *Div-$^h$Hookeri* · *curvans* keimte nicht. Selbstbestäubte *rubihookeri* schlank brachte 60 *Div-rubihookeri*, keine *Hookeri* (wohl nur zufällig), schwache *Div Div* sollte möglich sein; 38/55.

*Hookericurva nicht spreizkelchig.* Das Korrelat zu der *Div div-Hookeri, div div-hookericurva* (mit 8, $3 \times 2$), bringt bei Selbstung wie zu erwarten *M div-hookeri-curva* und *m div div-Hookeri* (6 bzw. 204 Pfl., 37/38).

*Nickende Hookeri als Crossover.* In der Kreuzung *hookericurva* × *Hookeri* war eine nicht marginate, aber trotzdem stark nickende, hohe Pflanze aufgetreten, augenscheinlich eine schlanke *Hookeri* als *Cu*-Crossover (36/48; Abb. 5, R. 1942). Bei Selbstung brachte sie *div-* und *Div-Hookeri*, beide als *cu* und als *Cu* (vgl. unten). Die meiotische Konfiguration der *Cu Div*-Form ist 6, $4 \times 2$. Am klarsten

ist das Verhalten der *Cu div div*. Das *Cu*-Chromosom kann unabhängig von *Div-div* getauscht werden, weil es nicht in dem 6er-Ring mit *Div* gekoppelt ist. Das *Cu*-Element muß ein gewöhnliches *Hookeri*-Chromosom sein, was die Enden betrifft, sein *Cu* also auf dem Weg des Crossing-over, nicht durch Translokation erworben haben, weil die *div div Cu-Hookeri* 7 Paare bildet. Diese kräftige *Cu-Hookeri* ist immer in *Cu* heterozygotisch, spaltet bei Selbstung aufrechte *Hookeri* ab, daneben können wenige schwache, gelbgrüne, krüppelhafte, schlecht blühende Pflanzen entstehen, sicher *Cu Cu-Hookeri* (Diakinese 7 × 2).

Abb. 11. *Oe. Cu—hookeriflava*, F. 43/120. 3. August 1943

Es waren 9 *Hookeri*, *Cu* und *cu*, keine gelben (43/115), und 75 *Hookeri*, 12 gelbe Krüppel (43/102). — Die Kreuzung *biennis* × *Cu cu-Hookeri* brachte 47 + 34 *albihookeri*, mehr *cu* als *Cu*, die *Cu* schwächer nickend als *Cu-Hookeri*, Krbl. 28:35, 30:40 mm, Diakinese ein 14er-Ring (44/323 und 46/93). — Bei der *hookerirubata* aus *Cu-Hookeri* × *biennis* wurden nur aufrechte Stengel gefunden (44/103); ob die *Cu*-Form zufällig ausblieb oder *Cu* in den Eizellen fehlte, ist nicht zu entscheiden. — Nach Selbstbestäubung der *Cu-albihookeri* keimten die Samen leider nicht (46/67); die *Hookeri* hätte als *Cu Cu* auftreten müssen. — Die Kreuzung *Cu-albihookeri* × *syrticola* brachte 9 blasse, bald sterbende $_{h}$*Hookeri* · *curvans*, keine grüne *albicurva* (46/88); $_{h}$*Hookeri* verdrängt also auch als *Cu*, wie gewöhnlich, *albicans* aus den Embryosäcken. — *Cu-albihookeri* × *suaveolens sulfurea* von Friedrichshagen brachte sehr stark nickende *Cu hookeriflava* (22 Stück, Diakinese 6, 4, 2, 2, wie von diesem *flavens*-Komplex zu erwarten, falls $^{h}$*Hookeri* typisch konstituiert ist; 46/49). — *Cu-hookeriflava* (aus 42/83, vgl. unten bei *Cu-Hookeri* schlank), stark nickend brachte bei Selbstung 53 *flava*, darunter *P Cu* wie die Mutter sehr stark nickend (Abb. 11), *P P Cu*, *P Cu* und *P P Cu* mit defektem Kelch, aufrechte *P* und *p* (43/120). Die *P Cu-hookeriflava* hat in der Meiose wie normal 4, 5 × 2.

Nach diesen Erfahrungen ist das Verhalten der schlanken *Cu-Hookeri*, die ja zuerst aufgetreten war, leichter zu beurteilen. Bei Selbstung entstehen grüne *Hookeri* normal und schlank, beide als *Cu* und als *cu*, und dazu kommen fast immer kleine, gelb grüne Pflanzen mit von unten her abfallenden Blättern, nicht oder sehr schlecht blühend, von denen nicht zu sagen ist, ob sie *Div Div* oder *Cu Cu* oder beides darstellen.

Es waren: aus dem ersten Crossover 14 *Hookeri*, 2 *Cu Div*, 12 *cu*, teils *Div* teils *div*; 37/39. — 70 grüne, *Div* und *div*, *cu* und *Cu*, und 12 schwache gelbgrüne, verzweigt, mit vielen gestauchten Zweiglein fast nicht blühend; nochmals gesät: 33 grüne, dazu 12 klein schwach schmalblättrig; 38/26 und 39/18 aus 37/39. — 80 grüne in 4 Typen, 20 schwach niedrig gelbgrün, nicht blühend; nochmals gesät: 94 grüne in 4 Typen, 16 schwach, sehr schmalblättrig, schlecht blühend, Knospen meist abfallend; 41/115 und 42/126 aus 39/18. — 50 grüne *Hookeri*, *div* und *Div*, nur *Cu* notiert, 15 gelb schwach; 42/80 aus 41/115. — Einige Kreuzungen bestätigen die Ergebnisse der Selbstungen. *Cu Div-Hookeri* (aus 41/115) × *biennis*: 33 *hookerirubata*, teils dunkelgrün groß, teils kleiner, gelblichgrün, stark nickend, teils kleiner grün-weiß gescheckt; 42/81. — *Cu Div-Hookeri* (aus 41/115) 3 × *p-albivelutina*: 45 *hookerivelutina*, mehr *div* als *Div*, mehr *cu* als *Cu*; 42/82. — *Cu Div-Hookeri* (aus

41/115) × *suaveolens*: 40 *hookeriflava*, davon 31 *div* dunkelgrün, *cu* und *Cu*, und *Div*, schwächer, gelblichgrün, unverzweigt oder wenig verzweigt, 7 *cu*, 2 *Cu*; 42/83.

Das Element von *curvans*, dem das Allel *Cu* angehört, hat also im homozygotischen Zustand subletale Wirkung.

*Zur Lage von Cu.* Daß *Cu* in der *flavicurva* dem Triplett 4.6, 5.13, 14.1 angehört, ist bekannt. Die Chromosomen 4.6 und 5.13 kommen in keiner anderen der von mir untersuchten Arten vor, 1.14 findet sich nach Baerecke (1944) in *percurvans* von *Oe. ammophila*. Die Verbindung *curvans · percurvans* ist hergestellt worden (R. 1940, S. 151; 1945, S. 167, 177); leider wurde die Meiose nicht untersucht, die ein freies Paar zeigen müßte, wenn die von Baerecke für *percurvans* abgeleitete Formel richtig ist. Wie alle diplarrhenen Bastarde ist *curvipercurva* wenig fruchtbar, und Austausch von *Cu* ist nicht beobachtet. Wäre auf dieses negative Ergebnis Verlaß, so könnte *Cu* nicht in 1.14 liegen. Einen kleinen Schritt weiter führt die durch Crossing-over entstandene *Cu-Hookeri*. In der $F_2$ der Verbindung *Cu div-$^h$Hookeri · flavens* kommt aufrechte *P P-hookeriflava* vor, *Cu* kann also weder in 1 noch in 4 liegen. Somit bleiben als Ort für *Cu* die Enden 5, 6, 13 (14?). Auf die Enden 5 und 6 hätte in der Verbindung mit *rubens* geprüft werden können, aber das ist leider unterblieben. Da die *Cu-Hookeri* verloren ist, läßt das Versäumnis sich nicht nachholen.

### *II. Curvihookeri und hookericurva mit syrticola-Plasma*

Die Kombination wurde gewonnen: a) als metakliner Bastard *curvihookeri* aus *syrticola* × *Hookeri*, b) aus der Kreuzung *rubiflava* mit *syrticola*-Plasma × *syrticola*, c) aus der Kreuzung *(syrticola* × *Hookeri) rigihookeri* × *syrticola*.

In allen 3 Herkünften war $^h$*Hookeri*, eine Familie der Linie c ausgenommen, als *div* wie als *Div*, im Pollen der *curva* nicht aktiv, wie die Selbstungen und die Verwendung zu Kreuzungen ausweisen. Zunächst wird man vermuten, $^h$*Hookeri* vertrage sich im Pollen nicht mit dem Plasma von *syrticola*. Dem widerspricht noch nicht ohne weiteres die Tatsache, daß man aus dem Pollen von *rigihookeri* Nachkommen erhalten kann (vgl. R. 1925, Nr. 480, 480b), obwohl *rigens* streng polleninaktiv ist. Typische *Hookeri* ist allerdings in $F_2$ von *rigihookeri* kaum gefunden, aber die beiden Komplexe haben ja 3 Chromosomen gemeinsam:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $^h$*rigens:* | $\binom{1\,(R)\,2}{1.2}$ | $\binom{3\,Pstr\,4}{3PStr4}$ | $\binom{5\,Sp^r6}{5\,Sp^h6}$ | $\binom{7.12 \quad 11.13 \quad 14.8}{12.11 \quad 13.14 \quad 8.7}$ |
| $^h$*Hookeri:* | | | | |

In den Eizellen sind sicher alle Kombinationen aktiv, im Pollen fehlt sicher das 3.4 von *rigens*, ob 1.2 und 5.6 von *rigens* ohne Schaden in den Pollen übernommen werden, ist unbekannt. Wenn nachgewiesen würde, daß im Pollen der *rigihookeri* reines $^h$*Hookeri* aktiv vorkommt, läge in *hookericurva* ein Analogiefall zu *M m B b-flavicurva* vor, für die ermittelt worden ist, daß im Pollen von den 8 zu erwartenden Kombinationen alle zu finden sind bis auf *m B-flavens*; diese elektive Inaktivierung wurde auf eine Schädigung durch *curvans* zurückgeführt (R. 1925, S. 162). Das Phänomen ist so bemerkenswert, daß *curvihookeri* und *rigihookeri* noch genauer geprüft werden sollten.

*a) curvihookeri aus syrticola* × *Hookeri. curvihookeri* selbst: 9 + 15 *M-hookericurva*, keine *m-Hookeri*; 26/277und 27/275. — *hookericurva* (aus 27/275) kleinblütig selbst: 28 *M-cuvar*, meist mit plumpen Knospen, keine *m-Hookeri*; 28/278.

*b) curvihookeri aus rubicurva × Hookeri.* Vorgeschichte. *R-syrticola × Lamarckiana: rigilaeta* und *rigivelutina*; 16/27. — *R-rigivelutina* (aus 16/17) × *syrticola:* u. a. *Str-velans · curvans;* 18/14. — *R-velocurva* (aus 18/14) × *R-biennis:* 22 *curvirubata; velorubata* fehlt, weil *R R;* 19/42. — *curvirubata* (aus 19/42) × *R-biennis:* 17 *curvirubata;* 20/22. — *curvirubata* (aus 20/22) × *M-suaveolens:* 40 *M-rubiflava,* 2 *curviflava;* 21/32. — *M-rubiflava* (aus 21/32) selbst: 39 *M R-rubiflava, Sp* und *sp,* ist $F_3$; 23/130. — *M Sp-rubiflava* (aus 23/130) selbst: 77 *M-rubiflava, Sp* und *sp;* 24/69. — *M R-rubiflava* (aus 24/69) × *M r sp-rubiflava* (aus *M R-rubiflava* × *r-biennis*): *rubiflava Sp* und *sp, R* und *r;* 25/47. — *M R Sp-rubiflava* (aus 25/47) × *r-syrticola:* 1 *flavicurva,* 15 *rubicurva;* 26/253. — *rubicurva* (aus 26/253) × *Hookeri:* 20 *rubihookeri,* 4 *curvihookeri* üppig; 27/155.

*curvihookeri* (aus 27/155) selbst: 20 *M-curvihookeri,* Blütengröße und Kelchgestalt sehr verschieden, große Blüten fehlen, keine *m-Hookeri;* 28/286.

*c) hookericurva aus rigihookerei × syrticola. hookericurva* [aus 24/71; *(syrticola × Hookeri) rigihookeri × syrticola*] selbst: 137 *M-hookericurva,* keine *m-Hookeri;* 25/86.

*hookericurva* (aus 25/86) × *Hookeri:* 14 *m-Hookeri,* keine typisch, 2 *M-hookericurva;* 26/258.

*hookericurva* (aus 25/86) × *syrticola:* 13 *M-hookericurva;* 26/259.

*r-biennis × hookericurva* (aus 24/71) 1: 3 *M-albicurva,* 13 kleine, gelbe Rosetten, wohl *rubens · curvans;* 25/84.

*M-albiflava × hookericurva* (aus 25/86): 17 *M albicurva,* 3 *M m-flavicurva,* keine *albihookeri,* keine *flavihookeri;* 26/260.

*r-biennis × hookericurva* (aus 24/71) 2: 5 *albicurva,* 6 *R-albihookeri,* teils normal, teils schlank spreizkelchig; 6 *r R-rubihookeri;* 30 gelbe, bald sterbend, wohl *rubens · curvans;* 25/83. — Diese *hookericurva* muß ein *[h]Hookeri* mit günstig wirkenden *rigens*-Elementen enthalten haben.

### *III. Hookericurva mit biennis-Plasma*

*Oe. (biennis × Hookeri) albihookeri* brachte bei Kreuzung mit *syrticola* 33 kräftige *hookericurva,* 1 *albihookericurva* triploid (27/283). Eine Folgegeneration wurde nicht aufgezogen, weil zu der Zeit die *curvihookeri* mit *syrticola*-Plasma keine sichtbare Spaltung zeigte.

### *IV. Hookericurva mit Lamarckiana-Plasma*

In der $F_2$ der zuerst analysierten *curvihookeri* fanden sich Individuen mit sehr stark spreizenden Kelchzipfelspitzen, die als *Spr Spr* (jetzt in *Div Div* zu ändern) angesprochen wurden (R. 1925, S. 114, Fig. 49d). Es könnte wohl sein, daß diese *Hookeri,* die aus *gaudens · [h]Hookeri* hervorgegangen ist und vielleicht Elemente von *gaudens* enthielt — schon ohne Crossing-over kommen die Chromosomen 1.2 und 5.6 in Betracht —, lebensfähige *Div*-Homozygoten zu bilden vermag. Im übrigen entsprechen die damaligen Rekombinationserscheinungen (Nr. 505 bis 509) den neuerdings gefundenen.

## Zusammenfassung

Von *Oenothera Hookeri* werden zwei recessive Genmutanten beschrieben, *pitys* mit meist einfachem Stengel und lückiger Inflorescenz, und *vitrea* mit glasig farblosen Keimlingen.

Die reziproken Bastarde zwischen *Oe. Hookeri* und *Oe. purpurata* haben, anders als früher beschrieben, gleich große Blüten.

Die Samen der *Oe. (biennis × Hookeri) albihookeri* aus Selbstbestäubung sind, obwohl sie größtenteils *Hookeri*-Embryonen enthalten, beträchtlich größer und schwerer als die der *Oe. Hookeri.*

Wenn die Komplexhomozygote *Oe. lutescens* (= *flavens · flavens*) mit einem der aus dem Pollenkomplex *flectens* der *Oe. atrovirens* stammenden Faktoren *lor* oder *Fl* ausgestattet wird, sind die *lor lor*- und die *Fl Fl*-Formen noch schwächlicher als bei Komplexheterozygoten wie *Oe. flaviflexa.*

Bei den *Fl*-Homozygoten, deren dünne einfache Stengel die blassen lichtempfindlichen Blätter von unten her abwerfen, so daß sie immer nur einen kleinen Blattschopf tragen, ist wohl ein Elementarprozeß gestört.

Die Spaltung der *Oe. (Hookeri* × *syrticola) hookericurva* ist der der *flaricurva* ganz analog, wenn der Bastard Plasma von *Oe. atrovirens* oder *Lamarckiana* besitzt. Mit dem Plasma von *Oe. syrticola* wird kein aktiver $^{h}$*Hookeri*-Pollen gebildet.

Als Crossover ist in der Nachkommenschaft von *hookericurva* eine stark nickende *Cu-Hookeri* aufgetreten, die nur als *Cu cu*-Form lebensfähig war.

Der Ort von *Cu* in *currans* ist noch immer nicht eindeutig zu bestimmen.

## Literatur


Baerecke, Maria-Luise: Zur Genetik und Cytologie von *Oenothera ammophila* Focke usw. Flora (Jena) **138**, 57—92 (1944). — Chrometzka, P.: Zur Kenntnis der Morphologie und des Wuchsstoffverhaltens der *Oenothera hybrida mut. helix*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 267—297 (1955). — Untersuchungen über den Wuchsstoff-Oxydase-Haushalt der Oenotherenmutanten *helix* und *nanella*. Planta (Berl.) **51**, 321—328 (1958). — Cleland, R. E.: Further data bearing upon circle-formation in *Oenothera*, its cause and its genetical effect. Genetics **17**, 572—602 (1932). — Krumbholz, G.: Über Verschiedenheiten in der Embryonengröße einiger Oenotheren und ihrer reziproken Bastarde. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **56**, 383—392 (1930). — Marquardt, H.: Über eine röntgeninduzierte Mutation mit abweichendem Erbverhalten bei *Oenothera Hookeri*. Flora (Jena) **137**, 152—165 (1943). — Marquardt, H.: Das Verhalten röntgeninduzierter Viererringe mit großen interstitiellen Segmenten bei *Oenothera Hookeri*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 415—4291 (1948). — Oehlkers, F.: Vererbungsversuche an Oenotheren. II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **31**, 201—260 (1923). — Renner, O.: Untersuchungen über die faktorielle Konstitution einiger komplexheterozygotischer Oenotheren. Bibl. genet. **9** (1925). — Zur Kenntnis der Letalfaktoren und des Koppelungswechsels der Oenotheren. Flora (Jena) **127**, 215—250 (1933). — Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **130**, 218—290 (1936). — Über *Oenothera atrovirens* und über somatische Konversion im Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **74**, 91—124 (1937). — Über die Beziehungen zwischen Heterogamie und Embryosackentwicklung und über diplarrhene Verbindungen. Flora (Jena) **134**, 145—158 (1940). — Über die Entstehung homozygotischer Formen aus komplexheterozygotischen Oenotheren. Flora (Jena) **135**, 201—238 (1941). — Über das crossing-over bei *Oenothera*. Flora (Jena) **136**, 117—214 (1942). — Zur Kenntnis des Pollenkomplexes *flectens* der *Oenothera atrovirens*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **81**, 391—483 (1943). — Über *Oenothera hybrida mut. helix*. Planta (Berl.) **42**, 30—41 (1953). — Rudloff, K. F.: Zur Kenntnis der *Oenothera purpurata* Kleb. und *Oe. rubricaulis* Kleb. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **52**, 191—235 (1929). — Rudloff, K. F., u. H. Stubbe: Mutationsversuche mit *Oenothera Hookeri*. Flora (Jena) **129**, 347—362 (1935).



Prof. Dr. O. Renner, Botanisches Institut der Universität, München, Menzinger Straße 67

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 148—158 (1959)

Department of Zoology, Columbia University, New York 27, N.Y.

# BACTERIAL MUTATION AND THE SYNTHESIS OF MACROMOLECULES*

By

Francis J. Ryan, Rivka Rudner, Toshio Nagata and Yoshiaki Kitani

With 8 Figures in the Text

*(Eingegangen am 5. Februar 1959)*

If natural or spontaneous mutations occur in *bacteria* that are not dividing (Ryan 1955, 1959), the possibility must be entertained that the *genes* themselves are, nonetheless, in a process of continued turnover. In this way the mutations might be errors in replication. On the other hand, modifications of the structure of genes could conceivably take place at appreciable rates without the involvement of replication—e.g., base sequences might be modified by breaks and rearrangement or substitution reactions might occur (Zamenhof, Reiner, di Giovanni and Rich 1956). Assuming that genetic replication requires the biosynthesis of one or more polymers, an approach to the problem would be to attempt to slow down such syntheses and determine whether, as a consequence, mutations diminished.

Chloramphenicol is one of a number of substances capable of interfering with the synthesis of three important polymers, protein, RNA, and DNA (Gale and Folkes 1953, Pardee and Prestidge 1956, Gros and Gros 1958). It can, according to the presence or absence of amino acids, differentially repress protein synthesis or interfere with both that and the synthesis of nucleic acids. It has been employed in analyses of the mechanism of induction of mutations by ultraviolet light (Witkin 1956, 1958, Doudney and Haas 1958, Haas and Doudney 1958, Lieb 1958) and may be useful in investigating natural mutation, as the present study claims to show.

## Material and Methods

The strain used was a histidineless mutant of *Escherichia coli* 15 ($h^-$) which mutates to a histidine-independent ($h^+$) condition. Evidence is at hand that this change takes place even in nondividing cells (Ryan 1959) and that it involves a modification of genotype (Ryan 1955). These references describe the methods employed. Basically, they involve growing a small washed inocula of $h^-$ $lac^+$ bacteria in 2 ml. lots of synthetic medium containing $2 \times 10^{-1}$ $\mu$g. histidine and 15 $\mu$g. glucose at 20° C. These supplements are simultaneously exhausted when *c.* $5 \times 10^7$ bacteria have been produced. At about 70 hr. when the bacteria have been in the stationary phase for some time, by the addition of 0.1 ml. aliquots, the cultures are brought to contain 0.05% (w/v) of sterile filtered lactose. In the presence of the excess salts and carbon source, the $h^+$ mutants among the histidine-starved $h^-$ bacteria overgrow to levels of *c.* $10^9$ and make the cultures turbid.

* This work was supported, in part, by grants from the American Cancer Society, U.S. Public Health Service and the National Science Foundation.

Those $h^+$ mutants present at the onset of the stationary phase overgrow first, at times that usually distribute themselves close to 100 hr. Thereafter, new overgrowths, which may continue to occur for more than 20 days, take place at a slower rate. The fraction of cultures without mutants, $P_0$, allows the calculation of the average number of mutations per tube ($m$), from the zero term of the Poisson equation

$$P_0 = e^{-m}. \tag{1}$$

When $m$ is plotted against time, two intersecting lines result (e.g., Fig. 1); the first steep rise is due to $h^+$ mutants arising during the growth of the $h^-$ bacteria; the second more gentle slope is due to $h^+$ mutants arising among the histidine-starved $h^-$ bacteria. The $m$ at the point of intersection allows calculation of the rate of mutation per $h^-$ bacterium per generation ($a$), during the previous growth of the culturencs, from the formulation

$$a = \frac{m \ln 2}{N} \tag{2}$$

where $\frac{N}{\ln 2}$ represents the number of bacteria-generations and $N$ the average number of bacteria per culture. The mutation rate, $a$, usually is close to $3 \times 10^{-8}$ which is the rate of mutation during growth as determined by plating the washed inoculum in agar devoid of histidine, counting the $h^+$ colonies at 48 hr. and using the median method of Lea and Coulson (1949), as well as by other independent methods.

The rate of mutation among the nondividing histidine-starved $h^-$ bacteria was determined from the formulation

$$\mu = \frac{km}{N_0(1 - e^{-kt})} \tag{3}$$

where $\mu$ is the chance of mutation per bacterium per hr., $m$ is the difference in the average number of mutations from $t_0$ after the curve bieats to $t_t$ in hr., $N_0$ is the average number of bacteria per culture at $t_0$ minus 83 hr., the time required for the overgrowth of a single $h^+$ (Ryan and Kiritani 1959), and $k$ is the constant for the rate of death during histidine starvation. This death occurs exponentially (e.g., Fig. 1) according to the equation

$$N_t = N_0 e^{-kt}. \tag{4}$$

Death was brought to a minimum by employing as a carbon source the sugar lactose, to which the glucose-grown cells became only partially adapted (Ryan 1959) and by maintaining them at 20° C. (Morrison, El Bagoury and Fletcher 1956).

Chloramphenicol (diagnostic, kindly supplied by Chas. Pfizer and Sons, Inc.) was utilized in concentrations of 10 $\mu$g. per ml. because without inducing undue death, it completely prevented growth. It was added in 0.1 ml. aliquots to the experimental cultures about 25 hr. after the addition of lactose. This interval allowed those $h^+$ mutants present in each culture to form clones and adapt to lactose. As expected, 25 hr. included an induction lag of *c.* 15 hr. and about 4 generations of growth. Such adapted $h^+$ bacteria were actually able to undergo 3—4 generations of growth in the presence of chloramphenicol, but very slowly over a period of *c.* 100 hr. Thereafter, they died at a rate of *c.* $10^{-2}$ per hr., somewhat faster than the rate of death of the $h^-$ parental bacteria (*c.* $10^{-3}$). In this way, $h^+$ mutants present at the time of chloramphenicol addition were assured survival even when released from its inhibition after as many as 300 hr. Unadapted $h^+$ mutants did not grow in chloramphenicol but the cells began to die immediately at an average rate of $1.5 \times 10^{-2}$.

Cultures suspended in chloramphenicol were released from its inhibition by a one hundredfold dilution into synthetic medium containing lactose. This procedure is sufficient to eliminate the inhibitory action of chloramphenicol, as was shown by the introduction of small numbers (an average of 3.3) of $h^+$ *lac*$^-$ bacteria into the histidine-starved $h^-$ *lac*$^+$ cultures in the presence of chloramphenicol. After 150 hr. the cultures were diluted 1 in 10; yet all the tubes were overgrown by $h^+$ *lac*$^-$ bacteria (*c.* 1.5 of 42 cultures were expected to be devoid of these introduced $h^+$ *lac*$^-$ bacteria). This experiment also suggests that in the presence of chloramphenicol the $h^+$ bacteria do not undergo excessive death.

In experiments where amino acids were employed, 0.1 ml. of a stock mixture was added so that the cultures were made to contain, per ml., 0.28 mg. of the L-forms of lysine, arginine, methionine, leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tryptophane, glutamic acid, proline, aspartic acid, $\beta$-alanine, glycine, serine, and hydroxyproline; 0.56 mg. of L-threonine; 0.15 mg. of L-tyrosine, and 1.40 mg. of L-cystine. Histidine was, of course, deliberately not added to this mixture, which proved to have insignificant amounts contaminating it. This was shown by inoculating small numbers of washed $h^-$ bacteria into synthetic medium supplemented with the amino acid mixture; plating revealed no significant increase in their number.

## Results

In three experiments involving 977 cultures, results of the sort shown in Fig. 1 were obtained. While the cultures contained chloramphenicol, no $h^+$ overgrowths took place, of course. But upon dilution no more adaptations occurred than could be accounted for by the $h^+$ mutants which were already present when the chloramphenicol was added (control curve). The average difference in $m$ at the intersection of the two curves for the control and for the experimental was only $+0.003$ and the probability that this could occur in the process of sampling was 0.10 by $\chi^2$ test. In experiments of this size any appreciable rate of mutation could have been detected. In the presence of lactose, even in a histidine-limited stationary phase, the $h^-$ bacteria become within 50 hr. adapted to use that sugar to the extent of half of the maximum complement of $\beta$-galactosidase (Ryan 1959). As a consequence, each $h^+$ mutant arising among them might be expected to be represented by at least one survivor at the end of the treatment with chloramphenicol. In this event a mutation rate ($\mu$) of $1.3 \times 10^{-11}$ could have been detected. If, on the other hand, the newly arisen $h^+$ mutants died at the rate ($k$) of $1.5 \times 10^{-2}$, characteristic of completely unadapted bacteria, a mutation rate ($\mu$) of $4.3 \times 10^{-11}$ would have been detected. Since whatever mutation took place in chloramphenicol occurred at less than these rates, it appears that in chloramphenicol the rate of mutation was reduced to something less than 10% of that occurring in its absence.

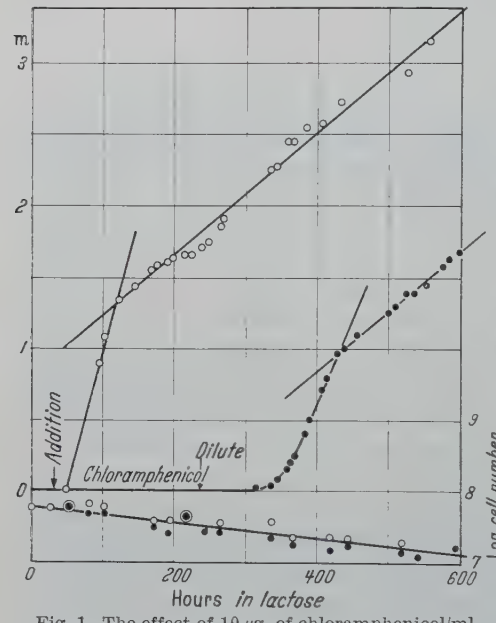



Fig. 1. The effect of 10 $\mu$g. of chloramphenicol/ml. in preventing the mutation of histidine-starved $h^-$ to $h^+$. (One of three similar experiments.) The upper open circles are results obtained in the absence of chloramphenicol; the upper filled circles, in its presence. The breaks in the curves represent rates of mutation ($a$) during previous growth of $1.8 \times 10^{-8}$ and $1.4 \times 10^{-8}$ respectively. Thereafter, stationary phase mutation occurred at rates ($\mu$) of $7.4 \times 10^{-11}$. The lower curve describes the average rate of death of the two kinds of cultures ($k = 2 \times 10^{-3}$)

The action of chloramphenicol was studied in another experiment conducted with 100 cultures in a somewhat different fashion (Fig. 2). Chloramphenicol was not added 25 hr. after lactose addition, but only after the first crop of mutants, developed during previous growth, had overgrown. This method is, in effect, like

that employed by Markovich (1958) in which penicillin is used to eliminate background mutants. It is clear that no $h^-$ mutants had accumulated during the

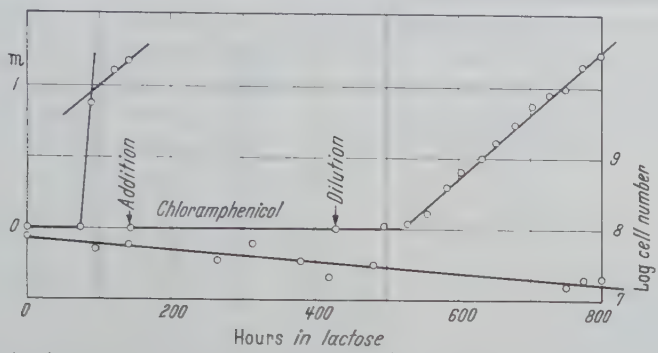



Fig. 2. Prevention by chloramphenicol of mutation to $h^+$ by histidine-starved $h^-$. The addition was not made until all $h^+$ mutants arising during growth had expressed themselves ($a = 1.0 \times 10^{-8}$). The absence of a break in the right-hand curve indicates that no mutants had accumulated in the cultures while chloramphenicol was present; mutation in the diluted culture took place at a rate ($\mu$) of $1.3 \times 10^{-10}$. The lower curve describes the rate of death ($k = 1.9 \times 10^{-3}$)

chloramphenicol treatment because the curve for increase in $m$ showed only one linear component, that characteristic of mutation in the histidine-starved stationary phase in which the diluted suspension was maintained. The absence of two intersecting curves reflects the absence of any appreciable mutation in the presence of chloramphenicol.

When chloramphenicol was accompanied by amino acids, however, mutations did occur, as shown in Fig. 3. The difference in $m$ determined from the breaks in the control and experimental curves in two experiments with 805 cultures was significant by $\chi^2$ test ($p = \ll 0.01$). The average rate of mutation ($\mu$) in the presence of chloramphenicol and amino acids was $9.1 \times 10^{-11}$, which is not different from that in their absence.

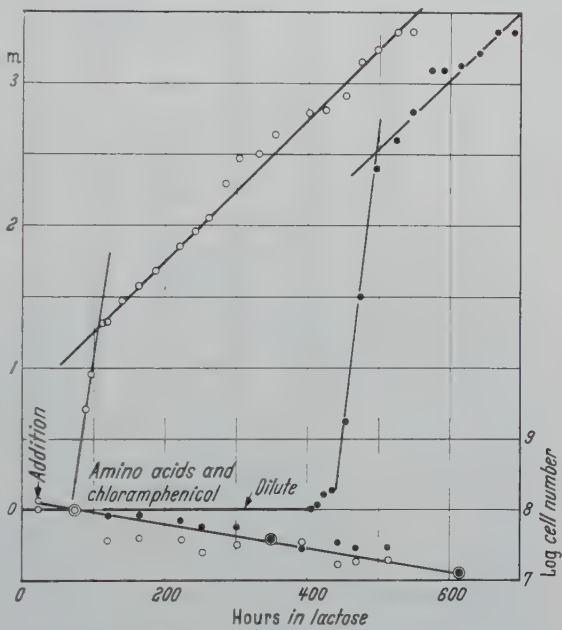



Fig. 3. The absence of an effect of chloramphenicol and amino acids on mutation to $h^+$ by histidinestarved $h^-$. One of two similar experiments. The upper open circles are results obtained in the absence, and the upper closed circles in the presence, of chloramphenicol and amino acids. The break in the former curve represents a mutation rate ($a$) during growth of $1 \times 10^{-8}$ and in the latter represents extra mutants occurring in chloramphenicol and amino acids at a rate ($\mu$) of $6 \times 10^{-11}$. Thereafter, the rates ($\mu$) were $8 \times 10^{-11}$ and $1.8 \times 10^{-10}$. The lower curve describes the average rate of death of the two kinds of cultures ($k = 3.2 \times 10^{-3}$)

The interaction of amino acids with chloramphenicol was also studied by the second method in two other experiments conducted with 212 cultures (Fig. 4). Chloramphenicol and amino acids again were not added 25 hr. after lactose addition, but only

after the first crop of mutants, developed during previous growth, had overgrown. Nonetheless, mutations took place in their presence at an average rate ($\mu$) of $1.3 \times 10^{-10}$, corrected for mutants arising in lactose previous to the addition of chloramphenicol and amino acids (cf. Figs. 2 and 4).

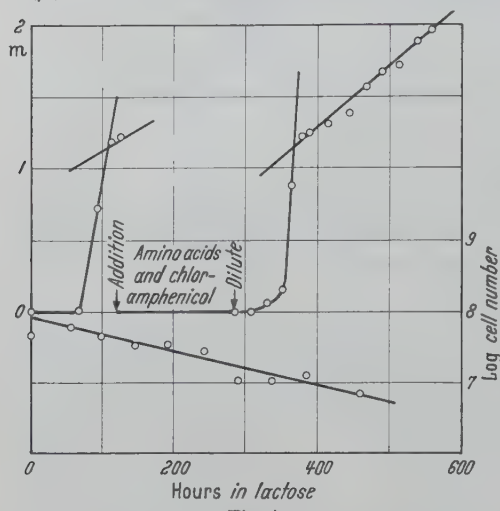



Fig. 4

In order to investigate the role played by the amino acids, they were added to the medium into which $h^-$ bacteria were diluted after starvation for histidine in the presence of chloramphenicol alone. The amounts of amino acid used were the same which had been added *with* the chloramphenicol to the undiluted cultures in the experiments described in Fig. 4, so that after dilution equal concentrations were achieved. No break in the curve describing the overgrowth of $h^+$ mutants after such dilution was observed (Fig. 5). Rather, all the 760 cultures in two experiments were overgrown as though mutations were occurring in the dilution medium at an average rate ($\mu$) of $1.5 \times 10^{-9}$. Either mutations were taking place in the

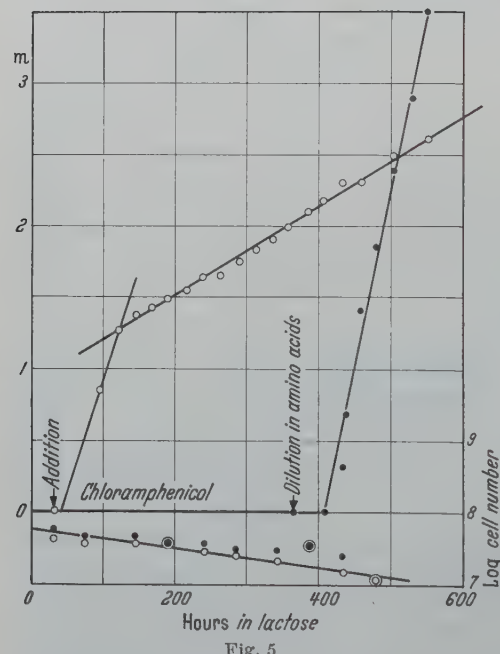



Fig. 5

Fig. 4. The absence of an effect of chloramphenicol and amino acids on mutation to $h^+$ by histidinestarved $h^-$. One of two similar experiments. The additions were not made until all $h^+$ mutants arising during growth had expressed themselves ($a = 1.9 \times 10^{-8}$). The break of the right-hand curve indicates a rate of mutation ($\mu$) in chloramphenicol and amino acids of $1.7 \times 10^{-10}$. Thereafter $\mu$ was $3.8 \times 10^{-10}$. The lower curve describes the rate of death ($k = 1.8 \times 10^{-3}$)

Fig. 5. The effect of the addition of amino acids, after starvation for histidine in the presence of chloramphenicol alone, on the appearance of $h^+$ mutants among $h^-$ bacteria. One of two similar experiments. The upper open circles describe the control in the absence of chloramphenicol; the mutation rate ($a$) during previous growth was $2 \times 10^{-8}$; thereafter it ($\mu$) was $1.1 \times 10^{-10}$. When the cultures in chloramphenicol were diluted in amino acids, $h^+$ mutants overgrew as though they were arising in the dilution medium with amino acids at a rate ($\mu$) of $1.1 \times 10^{-9}$. The lower curve represents the death of the two sorts of cultures ($k = 2.3 \times 10^{-3}$)

dilution medium because of the presence of freshly added amino acids, obscuring the overgrowth of those which had occurred during the initial growth of the culture, or the amino acids were revealing cryptic $h^+$ mutants which arose in the presence of chloramphenicol, but could not demonstrate themselves without the assistance of exogenous amino acids.

Among a variety of ways of exploring the relevance of these hypotheses, two were employed. One involved determining the effect of amino acids added to control cultures (without chloramphenicol) at the beginning and end of a long stationary phase. The results (of three experiments, one with a total of 134 cultures is shown in Fig. 6) were difficult to interpret because $m$ did not rise as two intersecting lines but rather as a complex curve. This could reflect the way in which mutation occurred in the presence of amino acids among cells that had been starved for histidine for various lengths of time in the absence of chloramphenicol; or the initial parts of the curves might actually represent the overgrowth of the cryptic mutants present at the time the amino acids were added. In the latter event, making the best possible estimates of the location of the break points, it could be demonstrated that no more cryptic $h^+$ mutants could be present after starvation for an average of 372 hr. than for only 150 hr. Furthermore, not enough could be found so that, when added to the $h^+$ mutants, originally present and newly arisen, that do express themselves in the absence of amino acids, their sum could cause all the cultures to become turbid, as was the case with experiments of the sort described in Fig. 5.

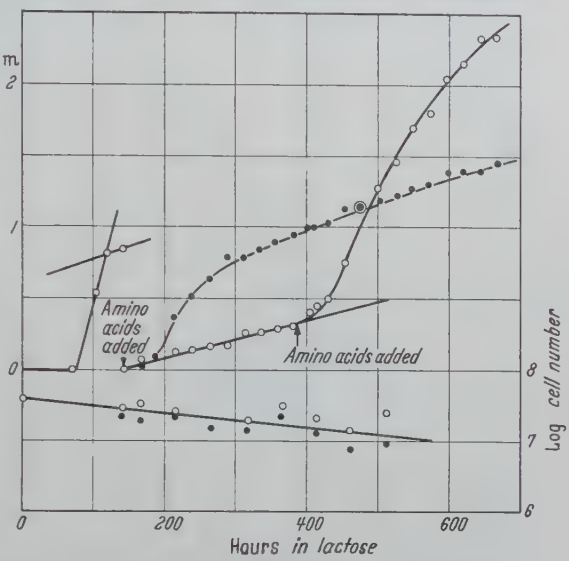



Fig. 6. The effect on mutation to $h^+$ of adding amino acids devoid of histidine to $h^-$ cultures starved for histidine after various times. In this representative of two experiments, the first addition was made immediately after all mutations arising during growth had expressed themselves ($a = 1.4 \times 10^{-8}$). The upper black circles represent subsequent behavior; the initial slope, if linear, represents a mutation rate ($\mu$) of $3.6 \times 10^{-10}$; thereafter it was $1.5 \times 10^{-10}$. Previous to the second addition of amino acids at 390 hr. the mutation rate ($\mu$) without amino acids was $5.3 \times 10^{-11}$; the final slope, if linear, indicates a rate ($\mu$) of $6.8 \times 10^{-10}$. The lower curve for control and experimental describes the rate of death ($k = 1.5 \times 10^{-3}$)

Relevant results were obtained when a more complex mixture, consisting not only of amino acids but also of nucleic acid derivatives and vitamins (Ryan 1959), was added in the course of histidine starvation. Here the curves were not complex but linear and without any evidence of a component of cryptic mutants whose growth was realized by the supplement.

A second method of discriminating between the two hypotheses involves plating ten $h^-$ cultures before, and some 243 hr. after, treatment with chloramphenicol. In the experiment depicted in Fig. 7, one member of a similar pair, the first plating was made 72 hr. after the addition of lactose, just before the first adaptations appeared. At 164 hr., when the adaptations due to mutation during growth had all taken place ($a = 3.0 \times 10^{-8}$), chloramphenicol was added. During the 243 hr. ensuing before the next plating, adaptations took place at a rate ($\mu$) of $3.4 \times 10^{-10}$ among the control cultures without chloramphenicol, although none occurred in the presence of chloramphenicol. During this interval death

took place in the cultures with and without chloramphenicol at a rate ($k$) of $3.3 \times 10^{-2}$.

The salient points are these:

1. All of the curves extrapolate to zero at the times when the first colonies of $h^+$ bacteria can be seen on the plates (15 hr. on amino acid agar and 19 hr. on minimal agar). The point of intersection of these curves with the ordinate (moved along the time axis to an extent equal to the time for an $h^+$ mutant introduced on the plate to form a colony) indicates the number of $h^+$ mutants present at the time of plating. Therefore, neither before nor after exposure to chloramphenicol are any mutants present which require amino acids for their expression.

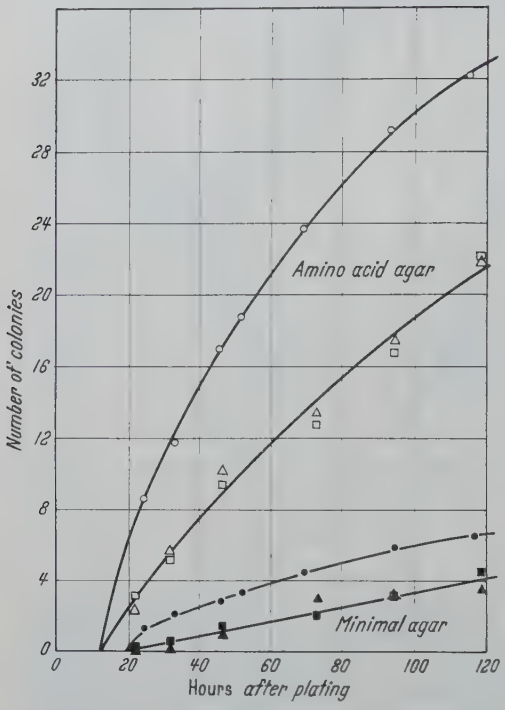



Fig. 7. The effect on mutation to $h^+$ of plating $h^-$ bacteria before and after treatment with chloramphenicol onto agar with and without amino acids. In this example of two similar experiments, the open and closed circles are for the numbers of $h^+$ colonies at different times on minimal agar, with and without amino acids respectively, after plating $h^-$ cultures before the addition of chloramphenicol. The open and closed squares are for the numbers of $h^+$ colonies formed on agar with and without amino acids when $h^-$ bacteria were plated after 243 hr. without chloramphenicol; similarly the open and closed triangles are for $h^-$ cultures treated with chloramphenicol for 243 hr. Assuming the last parts of these curves to be straight lines, the mutation rates ($\mu$) from top to bottom are c. $5 \times 10^{-8}$, $7 \times 10^{-8}$, $7 \times 10^{-9}$, and $1 \times 10^{-8}$

2. The slopes of the curves for the origin of $h^+$ mutants on plates containing amino acids were equivalent to mutation rates ($\mu$), averaging $6.1 \times 10^{-8}$, in confrast to $9.8 \times 10^{-9}$ for minimal agar. Therefore, the rate of mutation is increased by the presence of amino acids, just as it is by the presence of metabolizable sugars (RYAN 1959).

Even assuming as best one can that the curves in Fig. 7 represent two intersecting straight lines, the earlier of which is due to the overgrowth of mutants introduced on the plate, a few more cryptic mutants would be thought to be present at 0 time than after treatment with chloramphenicol. And even this assumption is unreasonable, for when already established $h^+$ mutants are introduced on plates with and without amino acids, all are visible as colonies in 15 and 19 hr. respectively; there is no distribution in time of appearance that would lead to the initial slope assumed if the curves in Fig. 7 are considered to be two intersecting straight lines. Further, the extrapolations made in Fig. 7 seem compelled inasmuch as they intersect the abscissa at exactly the time required for the appearance of colonies from introduced $h^+$ bacteria; any other hypothesis requires a coincidence to explain this fact. It is reasonable to conclude that the mutants described in Fig. 7 were not present at the time of plating but arose on the plates. Therefore, no evidence was found for cryptic mutants that required amino acids for expresion, but it is

clear that amino acids induce a high mutation rate among cells starved for histidine and free of chloramphenicol.

## Discussion

The amino acids may have this effect on mutation rate, not by acting as specific mutagens, but by stimulating the rate of metabolism. This could increase the rate of breakdown and resynthesis of, say, nucleic acid which would in turn increase the chance of mutation. In the presence of chloramphenicol where protein synthesis is depressed, the amino acids could be thought to have another role, that which they play in nucleic acid synthesis (Gros and Gros 1958). Thus, nucleic acid synthesis might be expected to occur when both chloramphenicol and amino acids are present and errors identified as mutations would be an inevitable, if rare, consequence.

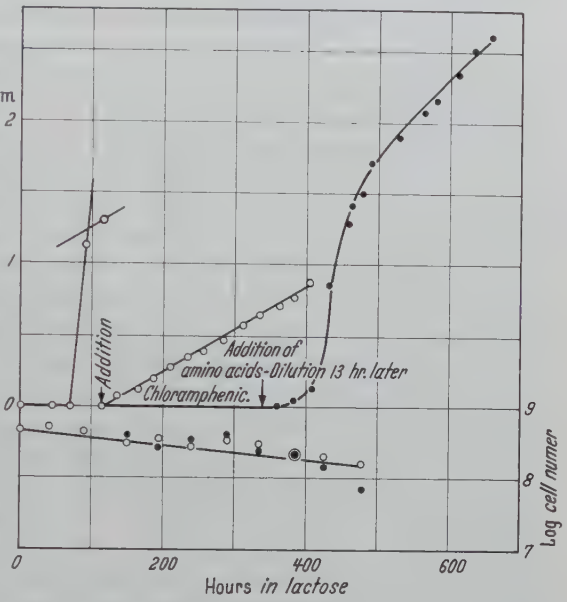



Fig. 8. The effect of adding amino acids 13 hr. before dilution of $h^-$ bacteria, starved for histidine and in the presence of 10 $\mu$g. chloramphenicol for 330 hr., on the rate of mutation to $h^+$. Chloramphenicol was not added until all mutants arising during growth had expressed themselves ($a = 1.9 \times 10^{-8}$). Thereafter the control bacteria (upper open circles) mutated at a rate ($\mu$) of $1.2 \times 10^{-10}$. Upon dilution from chloramphenicol (upper closed circles) adaptations occurred as though mutations were occurring in the diluted suspension at rates ($\mu$) decreasing from $1.1 \times 10^{-9}$ to $3.6 \times 10^{-10}$. The lower curve describes the average rates of death of the two kinds of cultures ($k = 2.0 \times 10^{-3}$)

If these considerations of the role played by chloramphenicol and amino acids are adopted, it becomes imperative to discriminate between effects on RNA and DNA. Since no chemical analyses of the systems described here have as yet been made, inferences can only be drawn from the literature. It appears that DNA synthesis is hardly affected by chloramphenicol in the absence of amino acids (Gros and Gros 1958) unless it is added before the synthesis of a specific protein (Drakulic and Errera 1958). A similar protein may somehow be necessary for DNA synthesis in the $h^-$ cells and may be present at the time their starvation in initiated, since they had been synthesizing DNA just before. But it well may be that after not too many hours of starvation this specific protein is broken down (Mandelstam 1958) so that DNA is no longer formed unless amino acids are also present with the chloramphenicol. Although a direct role of amino acids has been shown for the formation of only RNA (Gros and Gros 1958, Pardee and Prestidge 1956), protein synthesis seems a prerequisite for DNA synthesis (Drakulic and Errera 1958). It must be emphasized further that the present experiments were continued for a much longer time than is customary in related biochemical experiments. Because histidine might be made available during

protein degradation, the fact that it was absent from the amino acid mixture does not compel the belief that the latter would be inactive in allowing the synthesis of nucleic acids in the presence of chloramphenicol. Rather, the biochemical events must be determined anew for the present situation which in many regards is unique. One way to ascertain whether DNA replication occurs is by means of experiments utilizing the method of Meselson and Stahl (1958); these are now under way.

The present experiments do not *unequivocally* eliminate the hypothesis that amino acids reveal cryptic mutants that actually occurred in the presence of chloramphenicol alone. It is, however, the hypothesis of choice that the role of amino acids is simply to stimulate the rate of mutation when they are present by themselves. It might be thought that an experiment in which $h^-$ bacteria are treated with chloramphenicol plus amino acids and then washed free of the latter would allow determination of the time at which they act (e.g., in the presence of the concentrated inhibitory chloramphenicol or only after dilution). The removal of the amino acids from several hundred cultures is, however, an exceedingly difficult technical feat. Moreover, even if they were removed and the extra mutants still overgrew as in Figs. 3 and 4, how could one be sure whether during the slow protein synthesis that probably does occur in the presence of chloramphenicol, the $h^+$ mutant phenotypes were established because amino acids were present? Therefore, one could in this way distinguish between the two hypotheses only if the extra mutants were not manifest.

Certain quantitative relations in the experiments reported need assessment. In the experiments shown in Figs. 3 and 4 the amino acids present in the diluted suspension in which the adaptations due to mutation in chloramphenicol and amino acids were observed did not much increase the final steady mutation rate there. Yet the same amino acids were present in the diluted suspensions in the same concentrations as in the experiments exemplified by Fig. 5 where they appear to have increased the final steady mutation rate considerably. Further, as shown in Figs. 6 and 7, the amino acids do stimulate the rate of mutation. In the experiments represented by Fig. 6 the first addition of amino acids increased the rate of mutation but then it returned to normal as though the amino acids had been metabolized by the relatively young bacteria. The later addition of amino acids had a greater mutagenic effect but even that was afterwards reduced somewhat, as though the older cells were more prone to mutate but did not metabolize away the amino acids so rapidly.

A test of these presumptions is had in the experiment shown in Fig. 8 where chloramphenicol-treated histidine-starved bacteria were supplied with amino acids (in the same strong concentrations as when they were present from the beginning with chloramphenicol) and then diluted to eliminate the chloramphenicol inhibition some 13 hr. later. As can be seen, after dilution the number of adaptations increased rapidly so that $m$ rose in a curvilinear way as in Fig. 6. This result can be interpreted to mean that here also the older cells were prone to respond to the amino acids by mutating faster ($\mu = 1.1 \times 10^{-9}$) but that during the 13 hr. before dilution some of the amino acids were otherwise used by the cells, so that the result of the dilution is not as extensive as in the experiments represented by Fig. 5. Alternatively, one might imagine that during chloramphenicol treatment, which prevents appreciable nucleic acid synthesis, the

breakdown of nucleic acid nonetheless continues. This might result in the formation of a pool of nucleic acid precursors which, when amino acids are added, can be reconverted into nucleic acid despite the presence of chloramphenicol. The 13 hr. allowed would be sufficient, even at rates of synthesis less than maximal, for all the nucleic acid supposed to have been degraded to be resynthesized. If during this resynthesis mutations to $h^+$ took place with the same chance per replication as under other conditions, then as many mutations would be expected as if the amino acids had been present from the first introduction of chloramphenicol. On this basis a break in the curve might be assumed at an $m$ of about 1.5. This is equivalent to mutations occurring throughout exposure to chloramphenicol at a rate ($\mu$) of $1.1 \times 10^{-10}$ which is the same as that found in the presence of chloramphenicol and amino acids. The final constant rate of mutation, $3.6 \times 10^{-10}$, is slightly, if at all, different from normal and would imply that the amino acids had been mostly used up by the time of dilution.

It is impossible to discriminate between these hypotheses because, as was the case with the experiments in Fig. 6, that in Fig. 8 does not allow a definitive distinction between a curve of diminishing slope and one made of two straight lines such as had been found in other experiments.

The results of the experiments involving plating from chloramphenicol onto amino acid-agar (Fig. 7) seem the least equivocal in supporting the hypothesis that the role of amino acids after chloramphenicol treatment is to increase the mutation rate. There seemed, however, to be no greater tendency to mutate after chloramphenicol treatment. The higher absolute rates of mutation (average $\mu = 5 \times 10^{-9}$ on synthetic medium and $2.5 \times 10^{-8}$ on synthetic medium plus amino acids) can be accounted for in terms of the glucose present in the agar medium (Ryan 1959). In the liquid cultures containing only lactose the overall average rate of mutation ($\mu$) in eight experiments was $1.7 \times 10^{-10}$, while the two experiments of the sort shown in Fig. 6 gave average initial rates in the presence of amino acids of $1.0 \times 10^{-9}$. This rate corresponds closely to the average of the two experiments of the sort shown in Fig. 5 ($\mu = 1.6 \times 10^{-9}$) and to the initial rate, $1.1 \times 10^{-9}$, obtained after dilution in Fig. 8. This quantitative agreement lends support to the hypothesis that the effect of the addition of amino acids to the dilution medium is to increase the rate of mutation of the bacteria in the diluted suspension.

As a corollary, since no cryptic mutants were revealed in this way, the function of amino acids in the presence of chloramphenicol must have been to allow the occurrence of mutations which did not take place in chloramphenicol alone.

## Summary

An analysis was made of the effect of chloramphenicol on mutation in histidine-starved *E. coli* from a histidine-dependent to a histidine-independent condition. Although mutations occurred in the absence of chloramphenicol, none could be found in its presence unless it was accompanied by a mixture of amino acids, excluding histidine. The role played by the amino acids was concluded to be twofold:

1. In the absence of chloramphenicol they increased the rate of mutation indirectly by accelerating the rate of gene replication.

2. In the presence of chloramphenicol they *enabled* gene replication; as a consequence, rare errors or mutations took place at a rate limited by the rate of turnover of the genetic material.

The effect of chloramphenicol and amino acids on nucleic acid synthesis is such as to offer an account of this behaviour.

*Note added in proof:* Glass, E. A., and A. Novick [Induction of mutation in chloramphenicol-inhibited bacteria. J. Bact. **77**, 10—16 (1959)] report that mutations to phage T 5-resistance ocurs in *E. coli* during the first few hours of chloramphenicol treatment at about the same frequency per unit DNA synthesized as in the absence of chloramphenicol. Thus, the synthesis of DNA is a sufficient condition for mutation in the absence of appreciable protein synthesis but the role played by RNA, if any, is not elucidated.

## References

Doudney, C. O., and F. L. Haas: Modification of ultraviolet-induced mutation frequency and survival in bacteria by postirradiation treatment. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 390—401 (1958). — Draculic, M., et M. Errera: Relations entre synthèses de protéines et d'acide désoxyribonucléique chez *E. coli*. C. R. Soc. Biol. (Paris) **152**, 1208 (1958). — Gale, E. F., and J. P. Folkes: The assimilation of amino acids by bacteria. 15. Action of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. **53**, 493—498 (1953). — Gros, F., et F. Gros: Role des acides amines dans la synthèse des acides nucléiques chez *Escherichia coli*. J. Bact. **71**, 677—683 (1958). — Haas, F. L., and C. O. Doudney: Relations between nucleic acid and protein syntheses in ultraviolet-induced mutation in bacteria. Proc. X. Int. Congr. Genetics **2**, 108 abs. (1958). — Lea, D. E., and C. A. Coulson: The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. J. Genet. **49**, 264—285 (1949). — Lieb, M.: Relationships between mutation, phenotypic lag and protein synthesis. Proc. X. Int. Congr. Genetics **2**, 170 abs. (1958). — Mandelstam, J.: Turnover of protein in growing and nongrowing populations of *Escherichia coli*. Biochem. J. **69**, 110—119 (1958). — Markovich, H.: Recherches sur la mutabilité spontanée d'*Escherichia coli* B. Proc. X. Int. Congr. Genetics **2**, 179 abs. (1958). — Meselson, M., and F. Stahl: The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 671—682 (1958). — Morrison, R. B., S. E. El Bagoury and S. Fletcher: Effect of chloramphenicol in maintaining the viability of *E. coli*. Nature (Lond.) **178**, 1467 (1956). — Pardee, A. B., and L. S. Prestidge: The dependence of nucleic acid synthesis on the presence of amino acids in *Escherichia coli*. J. Bact. **71**, 677—683 (1956). — Ryan, F. J.: Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. Genetics **40**, 726—738 (1955). — Bacterial mutation in the stationary phase and the question of cell turnover. J. gen. Microbiol. (in press) 1959. — Ryan, F. J., and K. Kiritani: Effect of temperature on natural mutation in bacteria. J. gen. Microbiol. (in press) 1959. — Witkin, E. M.: Time, temperature and protein synthesis: A study of ultraviolet-induced mutation in bacteria. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 123—140 (1956). — Post-irradiation metabolism and mutagenesis in bacteria. Proc. X. Int. Congr. Genetics **1** (1958). — Zamenhof, S., B. Reiner, R. di Giovanni and K. Rich: Introduction of unnatural pyrimidines into DNA of *Escherichia coli*. J. biol. Chem. **219**, 165—173 (1956).

Professor Dr. F. J. Ryan, Dept. of Zoology, Columbia University in the City of New York, New York 27, USA

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 159—181 (1959)

Aus dem Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung Berlin-Dahlem

# UNTERSUCHUNGEN AN EINEM MUTABLEN BLÜTENFARBGEN VON *CALLISTEPHUS CHINENSIS* NEES

Von

WALTER HONDELMANN

Mit 6 Textabbildungen

*(Eingegangen am 4. Dezember 1958)*

## A. Einleitung

Untersuchungen an instabilen Genen sind so alt wie die moderne Genetik selbst, haben doch bereits die Wiederentdecker der Mendelschen Regeln, DE VRIES und CORRENS, in ihren Arbeiten über Mutationen das Vorkommen solcher, sich durch erhöhte Mutabilität auszeichnender Gene beschrieben. Als erster berichtete DE VRIES (1901, zit. nach STUBBE 1938) über *Antirrhinum majus rubrostriatum*. CORRENS folgte 1910 (zit. nach STUBBE 1938) mit den *variegata*- und *striata*-Rassen von *Mirabilis jalapa*, deren Charakteristikum darin besteht, daß variegate Pflanzen in ihrer Nachkommenschaft in wechselnder Zahl wieder Individuen mit normalfarbigen Laubblättern, ganzen Ästen oder auch ganzen Pflanzen aufwiesen. Seitdem ist in einer großen Zahl von Arbeiten das Problem der spontanen Genmutation diskutiert worden, so daß heute innerhalb der gesteigerten spontanen Mutabilität zwei Gruppen (STUBBE 1938) unterschieden werden können: 1. Labile Gene, die kontinuierlich über mehrere instabile Zwischenstufen zu einem neuen stabilen Endstatus mutieren und 2. mutable Gene, die diskontinuierlich, in einem Schritt, vom rezessiven zum dominanten Allel oder umgekehrt mutieren.

CORRENS gab den zuerst bekannt gewordenen Beispielen die grundlegende Deutung: In den *variegata*-Pflanzen mutierten einzelne Gewebe vom homozygot rezessiven in den heterozygot dominanten Status, so daß in der $F_1$ neben zahlreichen *variegata*-Pflanzen auch einfarbig grüne vorkamen. Die Vererbung des *striata*-Merkmals war grundsätzlich gleich. BAUR (1911 und 1918) wies für weitere derartige Mutationen den monohybriden Erbgang nach.

Einen neuen Gesichtspunkt brachten die Arbeiten von EMERSON (1917, 1929) mit der Feststellung, daß die gestreifte Färbung des Maisperikarps durch multiple Allele mit verschieden hoher Mutationsrate hervorgerufen wird. Die Mutationshäufigkeit wird aber auch durch die Homozygotie bzw. Heterozygotie der gestreiften Pflanzen beeinflußt.

Besonders aufschlußreich für das Problem der Genmutation wurden die Studien am Maisperikarp, als RHOADES (1938) die Umwandlung eines normalerweise stabilen Gens in ein hochmutables als Folge der Gegenwart eines besonderen, auf einem anderen Chromosom lokalisierten, dominanten Gens demonstrieren konnte, wobei zusätzlich modifizierende Gene beteiligt waren. Solche Gene, die gleichsam als Kontrollelemente auf die spontane Mutationsrate anderer Loci einwirken, wurden beim Mais noch häufiger entdeckt, so die als *Ac-Ds*-System (MCCLINTOCK 1951), als $P^{rr}$-*Mp*-System (BRINK 1954), als *Pg-En*-System (PETERSON 1953) und als *Spm*-$a_1^{m-1}$-System (MCCLINTOCK 1951) bekannten. Nach der

Abb. 1 Abb. 3 Abb. 5

Abb. 1—6: 1 Blütenkörbchen mit mutiertem (4/8) Sektor. 2 Blütenkörbchen mit mutiertem (5/8) Sektor. 3 Nicht mutiertes Blütenkörbchen ($g_0$-Allel). 4 Gesprenkelt mutiertes Blütenkörbchen ($g_2$-Allel). 5 Gesprenkelt mutiertes Blütenkörbchen ($g_4$-Allel). 6 Einfarbig mutiertes Blütenkörbchen ($G$-Allel)

Terminologie McClintocks sprechen wir in diesen Fällen von mutablen Genen, die eines besonderen Auslösers (Aktivators) bedürfen, um mutieren zu können. Ihnen stehen die mutablen Gene gegenüber, die autonom, d. h. ohne einen Auslöser, mutieren können. Hierzu zählen die eingangs beschriebenen Fälle, ferner das Gen *Yellow-inconstant* von *Pharbitis nil* (Imai 1930), die Gene *rose-alpha* und *lavender-alpha* bei *Delphinium ajacis* (Demerec 1931) und die *R*-Allele beim Mais (Stadler 1946). Alle vorgenannten Beispiele gehören in die Gruppe der eigentlich mutablen Gene, wohingegen das von Lilienfeld (1929, zit. nach Kappert 1953) beschriebene *laciniata*-Gen von *Malva parviflora*, ferner die Mutanten *crispa* von *Petunia nyctaginiflora* (Benl 1949) und *fimbriata* von *Antirrhinum majus* (Harte 1951) als labile Gene im engeren Sinne bezeichnet werden können.

Ein weiteres instabiles Gen, das nach seinem Verhalten in die Klasse der autonom mutablen Gene nach der Terminologie McClintocks gehört, wurde bei *Callistephus chinensis* Nees gefunden und seit 1956 von uns eingehend untersucht.

## B. Material

Das Material wurde dem Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung aus Kulturen der Samenzuchtfirma R. Schreiber & Söhne, Quedlinburg, wegen seiner starken Neigung zur Sportbildung für eine genetische Untersuchung überlassen. Es bestand aus Pflanzen, die entweder innerhalb eines sonst gelben Blütenkörbchens einzelne weiße Zungenblüten aufwiesen oder kleinere und größere weiße Sektoren oder sogar vollständig weiße Blütenkörbchen besaßen. Es konnten auch ganze Seitenäste oder eine ganze Pflanze weiße Blütenkörbchen tragen. Dieselbe Erscheinung fand sich auch bei anthocyanhaltigen Pflanzen; lachsfarbene Typen hatten rosa Sektoren oder Blütenkörbchen usw., stumpfblaue brachten mitunter leuchtendblaue. In allen drei Farbgruppen (weiß-gelb, rosa-lachsfarben und leuchtendblau-stumpfblau) traten auch gesprenkelte Blütenkörbchen auf, z. B. rosa gesprenkelt auf lachsfarbenem Hintergrund. Die Sprenkelung war mitunter verschieden stark ausgeprägt und konnte ebenso in Sektoren vorkommen, doch waren bisweilen auch unter den Gesprenkelten einfarbig rosa oder blaue Sektoren zu finden.

Mit der neuen Blütenfarbe zeigte sich eine an Blütenkörbchen mit Sektoren besonders gut zu beobachtende Erscheinung: Der mutierte Teil des Blütenkörbchens war, bedingt durch eine Verlängerung und Verbreiterung der Zungenblüten, größer als der nicht mutierte. Vgl. Abb. 1 und 2.

Alle genannten Phänotypen fanden sich sowohl unter ballförmigen als auch unter den straußenfederartigen Blütenkörbchenformen.

Das Arbeitsprogramm für das Studium der unterschiedlichen Farbtypen umfaßte zwei Teile:

1. Einen genetischen, innerhalb dessen die Natur und der Ort der Entstehung der Abänderungen untersucht werden sollte und

2. einen chemischen Teil, der Aufklärung über die unterschiedliche Wirkung der normalen und mutierten Allele auf die gebildeten Blütenfarbstoffe erbringen sollte.

## C. Genetische Untersuchungen und ihre Ergebnisse

### *1. Das Verhalten vollständig mutierter Pflanzen*

Im Versuchsjahr 1955 wurden einzelne vollständig mutierte Pflanzen, d. h. solche, deren Blütenkörbchen allesamt die neue Farbe zeigten, geselbstet und mit der rein gelben Handelssorte „Dr. Dürr" rückgekreuzt. Aus ihnen gingen 1956 die folgenden Spaltungsnachkommenschaften hervor: Nach Selbstung

54 mutierte + 22 nicht mutierte statt ideal
57 mutierte + 19 nicht mutierte ($P$ für 3:1 = 42%)

und nach Rückkreuzung

23 mutierte + 28 nicht mutierte statt ideal
25,5 mutierte + 25,5 nicht mutierte Pflanzen ($P$ für 1:1 = 50%).

Um die auf einen monohybriden Erbgang deutenden Ergebnisse nachzuprüfen, wurden eine Reihe weiterer Kreuzungen, Rückkreuzungen und Selbstungen in der nächsten Vegetationsperiode vorgenommen. Die Selbstungen weiterer vollständig mutierter Pflanzen brachten

466 mutierte + 155 nicht mutierte statt der Idealzahlen
465,25 mutierte + 155,75 nicht mutierte.

Die zu dieser einen Nummer vereinigten 9 Spaltungen zeigten Homogenität mit $P = 98\%$. Rückkreuzungen ebensolcher Pflanzen mit rezessiven Typen brachten

31 mutierte + 23 nicht mutierte statt der Idealzahlen
27 mutierte + 27 nicht mutierte.

Die Homogenität für die zu dieser einen Nummer zusammengefaßten 5 Spaltungen betrug $P = 78\%$.

Die gefundenen Spaltungen bestätigen also eindeutig die im Versuchsjahr 1956 erhaltenen Resultate. Demnach handelt es sich bei der Umwandlung der Blütenfarben in der Tat um eine einfach mendelnde Mutation. Gelbe, lachsfarbene und stumpfblaue Blütenphänotypen stellen die homozygot Rezessiven dar, weiße, rosa und leuchtendblaue die zunächst heterozygot dominanten Genotypen, die in der Spaltungsgeneration die zu erwartende Aufspaltung von 75% dominierenden (mutierten) auf 25% rezessive (nicht mutierte) Pflanzen geben[1]. Zu den gleichen Ergebnissen wie Rückkreuzungen mit sippeneigenen Rezessiven führten weitere Rückkreuzungen mit der sippenfremden, stabilen rezessiven Sorte „Dr. Dürr". Die sich in der Blütenfarbausprägung äußernde Merkmalsänderung ist also fixiert.

Die bei Annahme des heterozygoten Status der mutierten Pflanzen unter den Dominierenden der nächsten Generation zu erwartenden Homozygoten fanden sich tatsächlich in statistisch gut zu sichernden Spaltungsverhältnissen von 1 Homozygoten auf 2 Heterozygote.

### *2. Das Verhalten partiell mutierter Pflanzen*

Bei den Chimärenpflanzen mit normalen und mutierten Blütenkörbchen wurden sowohl vollständig mutierte Blütenkörbchen als auch sektorial mutierte zur Bearbeitung herangezogen.

Selbstbestäubungen vollständig mutierter Blütenkörbchen gaben in 7 Fällen eine 3:1-Spaltung mit insgesamt

432 mutierten auf 117 nicht mutierte Pflanzen statt der
411,75 mutierten auf 137,25 nicht mutierte im Idealfall ($P$ für 3:1 = 4,6%). Die hier zusammengefaßten Ergebnisse der 7 Nummern zeigten Homogenität mit $P$ = 38%. In Rückkreuzungen ebensolcher Blütenkörbchen mit rezessiven Typen wurde in 5 Fällen ein 1:1-Verhältnis mit

53 mutierten auf 55 nicht mutierte an Stelle der
54 mutierten auf 54 nicht mutierte im Idealfall zu erwartenden Pflanzen erhalten. Die zu dieser Spaltung zusammengefaßten 5 Nummern zeigten Homogenität mit $P$ = 48%. Es muß also geschlossen werden, daß auch in

[1] Als dominant wurden nur vollständig mutierte Pflanzen bonitiert, als rezessiv nicht mutierte und partiell mutierte (Chimärenpflanzen).

partiell mutierten Pflanzen außer der die Mutation manifestierenden Epidermis auch die subepidermale Gewebeschicht, aus der die Keimzellen entstehen, von der Mutation betroffen werden kann. In der Regel handelt es sich in solchen Fällen um frühzeitig angelegte Blütenkörbchen.

Daß jedoch in Chimärenpflanzen, die die Keimzellen liefernde Gewebeschicht von der Mutation unbeeinflußt bleiben kann, beweisen Selbstbestäubungen und Rückkreuzungen vollständig mutierter Schwesterblüten der eben genannten Körbchen, die also denselben Ästen entstammen, aber in ihren Nachkommenschaften keine Mendelspaltung zeigten. Vielmehr verhielten sie sich ähnlich den aus Bestäubungen sektorial mutierter oder auch nicht mutierter Blütenkörbchen hervorgegangenen Nachkommenschaften, die nur einzelne mutierte oder vollständig unverändert gebliebene Individuen aufwiesen. Rückkreuzungen mit der rezessiven Sorte „Dr. Dürr" ließen das gleiche genetische Verhalten erkennen wie Selbstungen[1].

Ganz unerwartet ist das Verhalten zweier Nummern, bei denen die Selbstungen der mutierten Sektoren, in diesem Fall zu $^5/_8$ mutierter Sektoren, nur mutierte Pflanzen unter den Nachkommen gab, während die Selbstungsnachkommenschaft eines nicht mutierten Blütenkörbchenteiles aus einem Schwesterblütenkörbchen keinerlei Anzeichen für Besonderheiten enthielt. In ihr trat nämlich keine einzige vollständig mutierte Pflanze auf. Die beiden nur aus vollständig mutierten Pflanzen bestehenden Nachkommenschaften (lediglich eine der beiden enthielt eine einzelne rezessiv gesprenkelte Pflanze) lassen sich durch die gleichzeitige Mutation beider Allele in den Körbchen der Mutterpflanze erklären; die gesprenkelte Ausnahmepflanze in der einen Nachkommenschaft könnte aus einer zufällig bei der Entfernung des übrigen Blütenkörbchenteiles stehengebliebenen Röhrenblüte stammen, die nach Selbstbestäubung diese eine Zygote entstehen ließ. Diese beiden Fälle bilden aber eine Ausnahme, im allgemeinen bleibt die Mutation bei Sektorenmutanten offenbar auf die Zellen des epidermalen Gewebes beschränkt.

Das in Bezug auf die Mutabilität teils gleiche, teils ungleiche Verhalten der Nachkommenschaften nicht mutierter, sektorial mutierter und vollständig mutierter Blütenkörbchen lassen die zwischen diesen Nachkommenschaften und dem Verhalten der Eltern durchgeführten Homogenitätstests erkennen.

Die Homogenitätstests wurden nach 2 Gruppierungen durchgeführt: a) nach nicht mutierten und mutierten Blütenkörbchen und b) nach einfarbig mutierten (je nach Größe des mutierten Bezirkes $^1/_8$—$^8/_8$ des Körbchens) und gesprenkelt mutierten (entsprechend der der Größe des gesprenkelten Sektors $^1/_4$—$^4/_4$) Blütenkörbchen. Zum Vergleich dienten — soweit vorhanden — nicht mutierte Blütenkörbchen.

Die Untersuchung von 74 Nachkommenschaften ergab praktisch alle denkbaren Möglichkeiten. Unterschiedliche Typen von Blütenkörbchen können gleichartige oder verschiedenartige Nachkommenschaften bringen, ebenso wie Körbchen gleichen Typs verschiedenartige oder gleichartige Nachkommenschaften haben können. Da sogar Nachkommenschaften aus nicht mutierten Schwesterblütenkörbchen ein und derselben Pflanze unterschiedlich sein können, besteht offenbar keine gesetzmäßige Beziehung zwischen dem Phänotyp eines Blütenkörbchens

[1] Die in diesen Nachkommenschaften auftretenden vollständig mutierten Pflanzen lassen sich als einzelne Mutanten, wie sie auch unter den Nachkommen aus nicht mutierten Blütenkörbchen gefunden wurden, erklären.

und dem Verhalten der aus ihm erhaltenen Nachkommenschaft. Daß stärker mutierte Blütenkörbchen nicht immer Nachkommen mit der höheren Mutabilität bringen, ist ein auffallendes Ergebnis. Eine gewisse Ähnlichkeit besteht aber zwischen Nachkommenschaften gleichartiger Blütentypen in bezug auf das Verhältnis der Mutationsklassen einfarbig und gesprenkelt, das in Nachkommenschaften gleichartiger Blütentypen häufiger Homogenität aufweist. Die generell bestehende Regellosigkeit in der Beziehung zwischen dem Phänotyp des Elternkörbchens und der Nachkommenschaft ist offenbar eine Folge der spontanen, vom Zufall abhängigen Mutationshäufigkeit, die durchaus nicht immer gleichzeitig im epidermalen und subepidermalen Gewebe wirksam wird.

Zu prüfen bleibt aber die Frage, ob sich aus der Mutabilität einer Nachkommenschaft in dem einen Jahr auf die Mutabilität der Tochtergeneration im nächsten Jahr Schlüsse ziehen lassen. Ein vorläufiger Vergleich von Eltern und Nachkommen der Kategorien stark und schwach mutierte Blütenkörbchen, abgesehen von vollständig mutierten Pflanzen, zeigt, daß durchaus nicht immer aus stark mutierten Eltern ebensolche Nachkommen oder aus wenig mutierten Eltern wenig mutierte Nachkommen hervorgehen.

Das offensichtliche Fehlen einer Beziehung erübrigt die Durchführung einer Korrelationsrechnung. Werden dagegen die in der Tabelle 3 aufgeführten nicht mutierten und mutierten Blütenkörbchen aus vollständig unveränderten bzw. aus vollständig mutierten Pflanzen miteinander verglichen, so ist ein Anstieg der Mutabilität festzustellen, und zwar von 7,08% der nicht mutierten Pflanzen auf 77,87 bzw. 80,53% der gesprenkelt mutierten Pflanzen. Die beiden gesprenkelt mutierten Gruppen sind untereinander homogen. An Hand einer 2mal-2-Tafel läßt sich die Korrelation zwischen Eltern und Nachkommen, z. B. für die Gruppen 1 und 3 berechnen. Für den Korrelationskoeffizienten $r$ ergibt sich ein Wert von 0,563. Da dieser Wert erheblich größer ist als der für eine Sicherungsgrenze von 0,1% gültige Zufallshöchstwert von 0,11 für $r$ (nach WEBER), unter Berücksichtigung von mehr als 1000 Freiheitsgraden, besteht eine gesicherte Korrelation zwischen dem Verhalten der Elternpflanze und der Mutabilität der Nachkommen in diesen Gruppen.

Untersucht wurde weiter auch das Mutationsspektrum in zwei aufeinanderfolgenden Generationen. Zu diesem Zweck wurden aus Selbstungen nicht mutierter Blütenkörbchen stammende Populationen, die ein bestimmtes Mutationsspektrum, ausgedrückt durch Zahl und Art der Mutationsklassen, aufwiesen, mit ihren wiederum aus nicht mutierten Blütenkörbchen hervorgegangenen Tochterpopulationen verglichen. Bis auf eine Ausnahme ergab der in 7 vergleichbaren Eltern- und Tochtergenerationen durchgeführte Test eine Übereinstimmung in der relativen Häufigkeit der gesprenkelt und einfarbig mutierten Blütenkörbchen. Eine Nachkommenschaft mit einem $\chi^2$ von 7,27 bei 1 Freiheitsgrad könnte noch als extreme Zufallsvariabilität angesehen werden, während eine zweite mit einem $\chi^2$ von 17,5 bei 1 Freiheitsgrad ganz offensichtlich Heterogenität der beiden Mutationsklassen andeutet. Über die Ursache dieser Ausnahme kann keine Aussage gemacht werden.

Aus der Mehrzahl der Versuche läßt sich also folgern, daß im Gegensatz zu der von Jahr zu Jahr stark schwankenden Mutabilität die relative Häufigkeit der beiden Mutationsklassen einfarbig und gesprenkelt sich in den Nachkommen nicht mutierter Blütenkörbchen von nicht mutierten Pflanzen gegenüber der der Elterngeneration wenig ändert. Vergleicht man dagegen das Verhältnis der Mutationsklassen einfarbig mutiert und gesprenkelt mutiert in Eltern- und Tochtergeneration gesprenkelter Pflanzen, so ist kein Zusammenhang erkennbar.

Über Mutabilitätsbeziehungen von instabilen Loci in zwei Generationen ist mehrfach berichtet worden. Harte (1950) fand für das *fimbriata*-Gen von *Antirrhinum majus* eine Beziehung zwischen dem Phänotyp der Elternpflanze und dem der Nachkommenschaft; und zwar waren die Blüten der Nachkommenschaft um so normaler, je stärker die Normalisierung der ganzen Infloreszenz und der Einzelblüte auf der Elternpflanze fortgeschritten war. Aus den zwischen den Nachkommenschaften bestehenden Differenzen wird gefolgert, daß genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen Blüten einer Pflanze und zwischen den verschiedenen Pflanzen vorliegen. Smith und Sand (1957) untersuchten die Hereditabilität der durchschnittlichen Sprenkelungsintensität variegater Pflanzen aus der Kreuzung *Nicotiana langsdorffii* × *N. sanderae* und erhielten eine eindeutige lineare Regression der Elternpflanzen auf die Nachkommen. Ferner fand sich in einigen Familien eine Korrelation zwischen der Sprenkelungsintensität der Eltern und auch zwischen der Häufigkeit der Sektoren in rezessivem Gewebe und der Häufigkeit bestimmter Allele in der Nachkommenschaft, Abhängigkeiten die nur genetisch bedingt sein können. Auch bei der Aster ist aus der Tatsache, daß die Mutabilität der Nachkommenschaft vom Typus der Elternpflanze, wenigstens wenn diese vollständig mutiert oder unverändert geblieben ist, abhängt, auf eine genetische Bedingtheit zu schließen. Auch daß die Relation der gesprenkelt mutierten zu einfarbig mutierten Blütenkörbchen in Eltern und Nachkommen praktisch gleich bleibt, läßt genetische Ursachen vermuten.

### *3. Multiple Allelie*

Im Versuchsjahr 1957 spalteten einzelne Selbstungen und Rückkreuzungen statt der erwarteten stumpfblauen, lachsfarbenen oder gelben rezessiven Genotypen in der Klasse der Rezessiven gesprenkelte Typen ab, z. B. rosa gesprenkelte auf lachsfarbenem Hintergrund. Drei Selbstungsnummern ergaben zusammengefaßt:

156 rosa einfarbige + 53 rosa gesprenkelte statt ideal
156,75 rosa einfarbige + 52,25 rosa gesprenkelte Pflanzen.

Die Homogenität beträgt $P = 27\%$. Vier Rückkreuzungsnummern ergaben zusammengefaßt:

33 rosa einfarbige + 37 rosa gesprenkelte statt der
35 rosa einfarbigen + 35 rosa gesprenkelten Pflanzen im Idealfall.

Die Homogenität beträgt $P = 94\%$.

Außer diesen in Spaltungsnachkommenschaften erhaltenen gesprenkelten Typen waren bereits aus den Vorjahren gesprenkelte Versuchsnummern vorhanden, die sich auch in den beiden Versuchsjahren 1956 und 1957, von einzelnen Mutationen zu einfarbig rosa abgesehen, als einheitlich gesprenkelt erwiesen. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Nach den erhaltenen Ergebnissen sind also außer dem rezessiven (mutablen) und dem dominanten (stabilen) Allel weitere Allele vorhanden, deren Dominanz entsprechend ihrer phänotypischen Ausprägung gegenüber dem rezessiven Allel abgestuft erscheint. Die Dominanz von einfarbig rosa mutiert gegenüber gesprenkelt rosa mutiert ergibt sich aus dem Versuch Nr. 109 AB, in dem aus der Kreuzung gesprenkelt rosa × einfarbig rosa ein Verhältnis von 1 gesprenkelt rosa : 1 einfarbig rosa erhalten wurde. Da eine Selbstung der Mutterpflanze

Tabelle 1. *Das Verhalten der Nachkommenschaften verschiedener Einzelpflanzen aus einheitlich gesprenkelten Versuchsnummern*

| Versuchsnummer Ausgangsmaterial 1957 | | Typ der Elternpflanze | Aussehen der Einzelblüte | Nachkommenschaft | Zahl der Pflanzen | Anmerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | a) Selbstungen | | | |
| | 109 J | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 51 | dieselbe Pflanze wie 109 G |
| | 109 L | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 78 | |
| | 109 M | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa einfarbig | einheitlich gesprenkelt | 91 | |
| | 109 O | nur gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 110 | |
| | 109 P | nur gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 114 | dieselbe Pflanze wie 109 O |
| 69/1954 | 109 Q | nur gesprenkelte Blüten | rosa schwach gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 60 | $P = 65\%$ für 3:1 |
| | 111 A | nur gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | 64 gesprenkelt : 19 schwach gesprenkelt | 83 | |
| | 116 A | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa einfarbig | einheitlich gesprenkelt | 114 | |
| | 116 B | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 50 | dieselbe Pflanze wie 116 A |
| | 125 B | nur gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 75 | |
| | 125 E | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa einfarbig | 85 gesprenkelt : 26 schwächer gesprenkelt | 111 | $P = 70\%$ für 3:1 |
| 25/1954 | 105 D | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | 39 gesprenkelt : 15 lachsfarben | 54 | $P = 64\%$ für 3:1 |
| 53/1954 | 110 D | nur schwächer gesprenkelte Blüten | rosa schwächer gesprenkelt | 80 schwächer gesprenkelt : 37 lachsfarben | 117 | $P = 10\%$ für 3:1 |
| | | | b) Kreuzungen und Rückkreuzungen: | | | |
| | 109 AB | ♀ überwiegend gesprenkelte Blüten ♂ nur einfarbig rosa Blüten | gesprenkelt × einfarbig rosa | 17 einfarbig rosa : 14 gesprenkelt | 31 | $P = 59\%$ für 1:1 |
| | 109 F | ♂ übrige Blüten normal gesprenkelt | „Dürr" × schwach gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 9 | |
| | 109 D | überwiegend gesprenkelte Blüten | gesprenkelt rosa × einfarbig | einheitlich gesprenkelt | 13 | ♀ und ♂ aus derselben Pflanze |
| | 109 G | ♂ überwiegend gesprenkelte Blüten | „Dürr" × einfarbig rosa | einheitlich gesprenkelt | 14 | |
| 69/1954 | 109 H | ♂ überwiegend gesprenkelte Blüten | „Dürr" × einfarbig rosa | 14 einfarbig rosa : 34 gesprenkelt | 48 | $P = 0{,}4\%$ für 1:1 |
| | 109 S | übrige Blüten gesprenkelt | gesprenkelt × gesprenkelt mit Sektor | einheitlich gesprenkelt | 32 | |
| | 125 C | überwiegend gesprenkelte Blüten | gesprenkelt × einfarbig rosa | einheitlich gesprenkelt | 13 | ♀ und ♂ aus derselben Pflanze |
| | 125 F | ♂ übrige Blüten schwach gesprenkelt | „Dürr" × einfarbig rosa | einheitlich schwach gesprenkelt | 6 | |
| | 125 D | überwiegend gesprenkelte Blüten | einfarbig rosa × gesprenkelt rosa | einheitlich gesprenkelt | 11 | reziproke Kreuzung von 125 C |
| | 125 G | ♀ überwiegend gesprenkelte Blüten | gesprenkelt × „Dürr" | 11 gesprenkelt rosa : 6 sehr schwach gesprenkelt | 17 | $P = 23\%$ für 1:1 |
| 53/1954 | 110 H | ♂ nur Blüten mit einzelnen Sprenkeln | „Dürr" × Blüte mit einzelnen Sprenkeln | einheitlich nicht mutiert | 38 | |

(Nr. 109 L) wieder einheitlich gesprenkelte Nachkommen brachte, war die gesprenkelte Pflanze offenbar homozygot, während der einfarbige Pollenlieferant heterozygot gewesen sein muß. Auch eine Schwesterpflanze des ♂-Elters erwies sich als heterozygot, da sie nach Selbstbestäubung eine im Verhältnis von 3 einfarbig rosa : 1 gesprenkelt rosa spaltende Nachkommenschaft brachte.

Der Sprenkelungstyp der Nr. 109 spaltete eine Reihe weiterer, in der Sprenkelungsintensität schwächerer Typen ab; in der Nr. 111 A einen gegenüber dem Ausgangstyp rezessiven, schwach gesprenkelten, in der Nr. 125 E einen noch schwächer gesprenkelten Typ, der in seiner Intensität zwischen den Nr. 111 A und 109 lag. In der Nr. 125 G brachte eine Rückkreuzung vom Typ 109 mit „Dr. Dürr" als rezessivem Rückkreuzungselter gesprenkelte Pflanzen, die zu etwa 50% den Typ 109, zu 50% einen sehr schwach gesprenkelten Typ repräsentierten. Der letzte brachte nach Rückkreuzung mit „Dr. Dürr" (Nr. 125 F) in der Nachkommenschaft ausschließlich diesen Sprenkelungstyp. Es dominiert also die Sprenkelung auch in dieser extrem schwachen Ausprägung noch über gelb. Auch die in der Nr. 110 D erhaltene Spaltung ist ein weiteres Beispiel für die durch Allele desselben Locus bedingten Zwischenstufen. Der hier aufgetretene Sprenkelungstyp ist intensitätsmäßig dem Typ 125 E ($g_1$) gleichzustellen.

Besonders betont sei, daß das Alter der Pflanze keinen Einfluß auf die Sprenkelungsintensität hat. Dieser Fall bildet also keine Parallele zu dem von Lilienfeld (1929, zit. nach Kappert 1953) studierten Verhalten des *laciniata*-Gens von *Malva parviflora*.

Aus dem rezessiven Allel für gelbe Blütenfarbe können also offenbar verschieden abgeänderte, über einfarbig gelb dominierende Allele hervorgehen, die eine multiple, von rezessiv gelb oder lachs über mehrere Sprenkelungsstufen bis zu einfarbig dominant reichende Serie bilden. Dabei entspricht dem phänotypischen Effekt das Dominanzverhalten der einzelnen Allele, so daß

$G >$ $g_4 >$ $g_3 >$ $g_2 >$ $g_1 >$ $g_0$ ist.

(einfarbig mutiert) (abnehmend gesprenkelt mutiert) (nicht mutiert)

(Vgl. Abb. 3—6).

Die ganze Reihe kann auch aus Selbstbestäubungen nicht mutierter Rezessiver hervorgehen. Ebenfalls können verschiedenfarbige Körbchen neben der gesprenkelten Zone einfarbig mutierte Sektoren, ja sogar mehrere verschieden stark gesprenkelte Bezirke enthalten.

Die einheitlich gesprenkelten Versuchsnummern bestehen vorwiegend aus Homozygoten, wie die meist einheitlichen Nachkommenschaften aus Selbstungen und Kreuzungen zeigen. Das Abspalten der gegenüber einfarbig rosa rezessiven Sprenkelungsallele $g_1$, $g_2$ und $g_3$ aus dem Typ 109 deutet auf eine erneute Mutation des $g_4$-Allels. In den Nr. 109 M, 109 Q und 116 A bringen Selbstungen der vom $g_4$-Typ abweichenden $G$- bzw. $g_2$-(109 Q)Blütenkörbchen die gleichen Resultate wie die Selbstungen typischer $g_4$-Körbchen. Offenbar erfolgte hier die Mutation nur in der epidermalen Schicht. In der Nr. 125 E ergab die Selbstung eines einfarbig mutierten Blütenkörbchens aus einer Pflanze mit sonst nur gesprenkelten Körbchen eine Aufspaltung in zwei Sprenkelungsallele. Das zeigt, daß die Mutation in der subepidermalen Schicht einen anderen Verlauf nehmen kann als in der Blütenepidermis.

Die Verhältnisse in den Kreuzungsnummern 109 D, 109 G, 109 S, 125 C und 125 D lassen sich ganz analog interpretieren: Die einfarbig rosa Blütenfarbe des

einen Kreuzungselters ist vermutlich auf die somatischen Zellen beschränkt geblieben. Auffallend ist die Rückkreuzung einer $Gg_4$-Pflanze in der Nr. 109 H wegen ihres erheblichen Rezessivenüberschusses — in diesem Falle gesprenkelter Pflanzen —, der darauf deutet, daß die Mutation in der einfarbig rosa ♂-Pflanze nicht die gesamte subepidermale Schicht erfaßt hat oder daß diese teilweise durch periklinale Teilungen des Dermatogens entstand. Das Ergebnis der Kreuzung 110 H („Dr. Dürr" × Blüte mit einzelnen Sprenkeln), das eine vollständig unverändert gebliebene Nachkommenschaft ergab, ist wohl so zu erklären, daß hier die Mutation nur in einzelnen Zellen des Dermatogens erfolgte.

Aus nicht einheitlich gesprenkelten Nachkommenschaften liegen die in Tabelle 2 wiedergegebenen Resultate vor, die durchweg die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse bestätigen. Die verschiedenen Sprenkelungstypen entsprechen jeweils den oben genannten. Überraschend ist der Ausgang der reziproken Kreuzung 108 D und 108 F. Der ♂-Elter von 108 D bzw. der ♀-Elter von 108 F sollte homozygot gesprenkelt sein, da eine Selbstung aus derselben Pflanze eine einheitlich gesprenkelte Nachkommenschaft (Nr. 108 G) ergab. Dem entspricht das Rückkreuzungsergebnis der Nr. 108 F mit ausschließlich gesprenkelten Nachkommen, während das der Nr. 108 D nur so zu erklären ist, daß das benutzte Körbchen durch eine Rückmutation heterozygot geworden war, was dann nach Rückkreuzung eine im Verhältnis von 1 gesprenkelten : 1 lachsfarbenen Pflanze spaltende Nachkommenschaft bringen muß.

Alle durchgeführten reziproken Kreuzungen ergaben bis auf diese durch eine Rückmutation in der Nr. 108 D erklärbare Ausnahme keinerlei Unterschiede. Ein cytoplasmatischer Einfluß auf den Mutationsvorgang kann daher ausgeschlossen werden.

Die der beobachteten Sprenkelung zugrundeliegende Wirkungsweise der Gene läßt mehrere Deutungen zu. So kann es sich, wie es von RHOADES (1938) für das vom Gen *Dotted* abhängige Sprenkelungsphänomen auf dem Maisperikarp angenommen wird, um in einzelnen Zellen oder Zellgruppen mutierte Genwirkungen handeln. Derselbe Effekt ist aber auch von einem in nicht allen Zellen des Gewebes wirksam werdenden Gen zu erwarten. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß diese Art der Genwirkung bei den Sprenkelungsstufen in der Asternblüte vorliegt, weil sie bei der Blütenpigmentierung, z. B. bei bestimmten Farbmustern, durchaus anzutreffen ist. Schließlich ist wegen der nicht ausschließlich in einer Richtung sich vollziehenden Abänderung (vgl. den folgenden Abschnitt C 4) ein genetisch festgelegter Förderungs- bzw. Hemmungsmechanismus für die Pigmentbildung denkbar, der zur Ausbildung der Endstufe (voll ausgefärbt) einen bestimmten Schwellenwert erfordern würde. Diese Möglichkeit wird u. a. von SMITH und SAND (1957) für die im Bastard von *Nicotiana langsdorffii* × *N. sanderae* auftretende Blütenvariegation diskutiert.

### *4. Mutationsrichtung*

In der Asternblüte ist das Vorkommen der Blütenpigmente auf die Epidermis beschränkt. Daher braucht eine Farbänderung, wie aus den besprochenen Resultaten hervorgeht, nicht erblich zu sein. Das ist nur dann der Fall, wenn die Erbänderung gleichzeitig auch das subepidermale Gewebe betrifft. Umgekehrt kann eine Mutation aber auch nur im subepidermalen Gewebe erfolgt sein, so

*Tabelle 2. Ergebnisse aus Nachkommenschaften verschiedener Einzelpflanzen nicht einheitlich gesprenkelter Versuchsnummern*

| Versuchsnummer | Typ der Elternpflanze | Aussehen der Einzelblüte | Nachkommenschaft | Zahl der Pflanzen | Anmerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| | | a) Selbstungen: | | | |
| 107 G | rosa gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 64 | |
| 107 H | schwächer gesprenkelte Blüten | schwächer rosa gesprenkelt | einheitlich schwächer gesprenkelt | 23 | |
| 108 G | überwiegend gesprenkelte Blüten | rosa gesprenkelt | einheitlich gesprenkelt | 22 | |
| 112 G | überwiegend schwächer gesprenkelte Blüten | schwächer rosa gesprenkelt | 84 schwächer gesprenkelt : 29 lachsfarben | 113 | $P = 86\%$ für 3:1 |
| 117 A | schwach dunkelblau geprenkelte Blüten | schwach dunkelblau gesprenkelt | 16 schwach dunkelblau gesprenkelt : 7 stumpfblau | 23 | $P = 41\%$ für 3:1 |
| 117 B | überwiegend schwächer dunkelblau gesprenkelte Blüten | schwächer dunkelblau gesprenkelt | 62 schwächer dunkelblau gesprenkelt : 24 stumpfblau | 86 | $P = 86\%$ für 3:1 |
| 126 D | überwiegend gesprenkelte Blüten | einfarbig rosa | 18 rosa gesprenkelt : 5 lachsfarben | 23 | $P = 88\%$ für 3:1 |
| | | b) Rückkreuzungen: | | | |
| 103 H | ♀ weiß gesprenkelte Blüten ♂ überwiegend einfarbig weiße Blüten | weiß gesprenkelt × weiß einfarbig | 5 einfarbig weiß : 3 gesprenkelt weiß | 8 | |
| 106 A | ♀ gelbe Blüten ♂ überwiegend weiß gesprenkelte Blüten | einfarbig gelb × weiß gesprenkelt | 8 einfarbig gelbe : 10 gesprenkelt weiß | 18 | $P = 64\%$ für 1:1 |
| 107 Q | ♂ überwiegend schwächer gesprenkelte Blüten | „Dürr" × schwächer rosa gesprenkelt | einheitlich schwächer gesprenkelt | 11 | |
| 108 B | ♂ schwach rosa gesprenkelte Blüten | „Dürr" × schwach rosa gesprenkelt | 4 lachsfarben : 2 schwach gesprenkelt | 6 | |
| 108 C | ♀ überwiegend lachsfarbene Blüten ♂ überwiegend gesprenkelte Blüten | lachsfarben × rosa gesprenkelt | 5 rosa gesprenkelt: 5 lachsfarben | 10 | |
| 108 D | ♀ überwiegend lachsfarbene Blüten ♂ überwiegend rosa gesprenkelte Blüten | lachsfarben × rosa gesprenkelt | 11 lachsfarben : 13 rosa gesprenkelt | 24 | $P = 70\%$ für 1:1 |
| 108 F | ♀ überwiegend gesprenkelte Blüten ♂ überwiegend lachsfarbene Blüten | rosa gesprenkelt × lachsfarben | einheitlich gesprenkelt | 19 | |
| 117 F | ♀ überwiegend einfarbige dunkelblaue Blüten ♂ nur gesprenkelt dunkelblaue | einfarbig dunkelblau × gesprenkelt dunkelblau | 5 einfarbig dunkelblau : 3 gesprenkelt dunkelblau | 8 | |
| 117 G | ♀ überwiegend dunkelblau schwach gesprenkelte Blüten | schwach dunkelblau gesprenkelt | 3 dunkelblau schwach gesprenkelt | 3 | |
| 126 C | ♀ überwiegend lachsfarbene Blüten ♂ überwiegend einfarbige rosa Blüten | einzelne Sprenkel × einfarben rosa | 20 rosa gesprenkelt : 28 lachsfarben | 48 | $P = 25\%$ für 1:1 |

daß sie sich nicht manifestiert, sondern erst in der Tochtergeneration nachgewiesen werden kann, wie das bei der Nr. 108 D der Fall gewesen sein muß. Als weitere, zunächst subepidermal aufgetretene Mutationen wurden die Sprenkelungsallele $g_1$, $g_2$ und $g_3$ entdeckt, die als rezessive Genotypen aus dem Allel $g_4$ herausspalteten und in diesen Spaltungen als Rückmutationen — in Richtung auf das ursprüngliche $g_0$-Allel der untersuchten Sippen — zu bezeichnen sind[1].

Die Hauptrichtung der Mutation verläuft von rezessiv zu dominant. Sie kann sich in mehreren Generationen stufenweise vom Ausgangsallel $g_0$ (gelb, lachs bzw. stumpfblau) bis zum Endallel $G$ (weiß, rosa bzw. leuchtendblau) vollziehen, doch kann sich auch $g_0$ in ein höheres Glied der Reihe oder direkt in $G$ verändern. Ebenso mutieren die anderen $g$-Allele entweder direkt zu $G$ oder zu einem dazwischenliegenden Allel.

Rückmutationen sind bisher nur unter den instabilen Sprenkelungsallelen beobachtet worden, wobei die Stufen ebenfalls übersprungen werden können. Für das offensichtliche stabile Endallel $G$ konnten Rückmutationen nicht nachgewiesen werden.

Auch das gleichzeitige Auftreten von Mutation und Rückmutation in einem Blütenkörbchen ist möglich, wie die Nr. 125 E beweist: Einer auf der Epidermis lokalisierten Mutation zu $G$ steht eine sich in der subepidermalen Schicht abspielende Mutation von $g_4$ zu $g_2$ gegenüber. Beide Vorgänge können sich also unabhängig voneinander vollziehen.

Die für die überwiegende Mehrzahl instabiler Loci nachgewiesene Mutationsrichtung von rezessiv zu dominant wird von GUSTAFSSON und v. WETTSTEIN (1958) durch die Annahme erklärt, daß das rezessive Allel durch eine labile Umlagerung in der Struktur des dominanten Ausgangsallels entstanden sei, die sich leicht wieder in den ursprünglichen Zustand umändern könne. STADLER (1951) glaubt dagegen, daß die Bevorzugung dieser Mutationsrichtung oftmals nur eine scheinbare sei, denn der umgekehrte Vorgang muß der Beobachtung deshalb meist entgehen, weil es bei einer Mutation in homozygoten Individuen zunächst nicht zu einer phänotypischen Manifestation kommen kann. Zu den weniger häufigen Fällen einer Mutation nach beiden Richtungen, wenn auch mit Bevorzugung der Mutation von rezessiv nach dominierend, gehört die Veränderlichkeit des $g$-Locus der Aster.

### *5. Häufigkeit der Mutationsallele*

Die in Nachkommenschaften nicht mutierter Blütenkörbchen meistens beobachtete gute Übereinstimmung von Elter- und Tochtergeneration im Verhältnis der einfarbig mutierten und gesprenkelt mutierten Blütenkörbchen verdient eine Nachprüfung.

Hierzu wurden aus Nachkommenschaften nicht mutierter Blütenkörbchen die vollständig mutierten Körbchen auf ihren Mutationstyp und dessen Häufigkeit untersucht und die Ergebnisse mit den aus Nachkommenschaften gesprenkelt mutierter Blütenkörbchen vom Alleltyp $g_2$ und $g_4$ erhaltenen Resultate verglichen. Dabei ergab sich das in Tabelle 3a wiedergegebene Bild. Die als Homogenitätstests durchgeführten Vergleiche erwiesen die Inhomogenität der Gruppen 1 ($g_0$-Allel) und 2 ($g_2$-Allel) hinsichtlich der Gesamtzahl der

[1] Als Mutation wird die Änderung der den Ausgangssippen eigenen Gene in neue, hier stets dominierende Allele bezeichnet, ohne Rücksicht darauf, welches Allel als das ursprüngliche Wildallel zu gelten hat.

mutierten Blütenkörbchen und gleichfalls für die einzelnen Allele im Verhältnis zur Gesamtzahl der mutierten Blütenkörbchen in diesen beiden Gruppen.

Die Gesamtmutabilität steigt in den Nachkommenschaften der gesprenkelten Pflanzen vom Alleltyp $g_2$ gegenüber $g_0$ an. Das zeigt sich in erster Linie in der Zunahme der $g_4$-Allele. In der Häufigkeit der Allele $g_2$, $g_3$ und $G$ ist jedoch — bezogen auf die Gesamtzahl der mutierten Blütenkörbchen — ein Abfall festzustellen. Allein die das $g_4$-Allel repräsentierenden Blütenphänotypen nehmen zu; ein Verhalten, wie es zu erwarten ist, wenn die Gesamtmutabilität eine obere Grenze hat. Hinsichtlich der Gesamtzahl mutierter Blütenkörbchen sind die

Tabelle 3. *Häufigkeit der Mutationsallele in Nachkommenschaften aus Pflanzen von verschiedenem Typ des Blütenkörbchens*

| Gruppe | Typ der Elterpflanze | Aussehen des benutzten Blütenkörbchens | Gesamtzahl der Blütenkörbchen | Gesamtzahl mutierter Blütenkörbchen | Gesamtzahl gesprenkelter Blütenkörbchen | Häufigkeit der Mutationsallele | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | $g_1$ | $g_2$ | $g_3$ | $g_4$ | $G$ |
| a) 1 | nm ($g_0$) | nm ($g_0$) | 28752 | 2041 | 1674 | 9 | 147 | 57 | 1461 | 367 |
| 2 | $^4/_4$ ($g_2$) | $^4/_4$ ($g_2$) | 628 | 489 | 447 | 0 | 18 | 6 | 423 | 42 |
| 3 | $^4/_4$ ($g_4$) | $^4/_4$ ($g_4$) | 12151 | 9789 | 9296 | $2^1$ | $130^1$ | $12^1$ | 9152 | 493 |
| b) 1 | nm ($g_0$) | nm ($g_0$) | 1864 | 56 | 48 | 0 | 3 | 1 | 44 | 8 |
| 2 | $^4/_4$ ($g_2$) | $^4/_4$ ($g_2$) | 45 | 19 | 16 | 0 | 1 | 0 | 14 | 2 |
| 3 | $^4/_4$ ($g_4$) | $^4/_4$ ($g_4$) | 762 | 415 | 400 | 0 | $2^1$ | 0 | 398 | 15 |

a) = nicht vollständig mutierte Pflanzen, b) = vollständig mutierte Pflanzen; nm = nicht mutiert, $^4/_4$ = vollständig mutiert, $^1$ = Rückmutationsallel.

Gruppen 2 ($g_2$-Allel) und 3 ($g_4$-Allel) homogen. Zwar unterscheiden sich die aus $g_4$-Blütenkörbchen erwachsenen Typen von den übrigen in der Häufigkeit der verschiedenen Mutationsallele, die hier bis auf $g_4$ und $G$ Rückmutationen darstellen, doch bleibt die Reihenfolge der Häufigkeit der verschiedenen Typen die gleiche wie in den übrigen Versuchen.

Auch wenn nur vollständig mutierte Pflanzen aus diesen Nachkommenschaften zur Bestimmung der Allelhäufigkeiten herangezogen werden, bleibt die Reihenfolge der Mutationshäufigkeit dieselbe (Tabelle 3b). Die scheinbare Zunahme der Häufigkeit der vollständig mutierten Pflanzen von Gruppe 1 zu Gruppe 3 ist aber nur die Folge der Steigerung der Mutabilität überhaupt (vgl. Tabelle 3a), die auch in der Zahl der abgeänderten Blütenkörbchen zum Ausdruck kommt.

### *6. Mutationshäufigkeit während der Entwicklung der Pflanze*

Der unterschiedliche Zeitpunkt des Mutationsereignisses manifestiert sich phänotypisch durch die flächenmäßig verschiedene Ausprägung der Merkmalsänderung in den Blütenkörbchen. Je nachdem, ob die Mutation zu einem früheren oder späteren Stadium während der Entwicklung der Pflanze eintrat, muß der Anteil des mutierten Bezirkes im Blütenkörbchen größer oder kleiner sein. Sehr früh aufgetretene Mutationen führen zu vollständig mutierten Blütenkörbchen.

Wird wie in Tabelle 4 die Häufigkeit der Blütenkörbchen mit Sektoren mit der der vollständig mutierten Blütenkörbchen verglichen, und zwar sowohl für einfarbig mutierte als auch für gesprenkelt mutierte Phänotypen, so zeigt sich, daß die vollständig gesprenkelten Körbchen gegenüber den sektorial gesprenkelten

sehr stark überwiegen, d. h., daß die Mutation von $g_0$ nach $g_1$—$g_4$ vornehmlich in einem frühen Entwicklungsstadium des Blütenkörbchens erfolgt. Das ungefähr gleichhäufige Auftreten von sektorial und vollständig nach $G$ mutierten Körbchen läßt darauf schließen, daß die Mutation von $g_0$ nach $G$ gleichmäßiger während der ganzen Entwicklung eintritt. Zwischen den einzelnen Versuchen bestehen zwar, wie es ein Homogenitätstest zeigt, erhebliche graduelle Unterschiede, doch ist prinzipiell das Verhalten der verschiedenen Kategorien das gleiche.

Tabelle 4. *Häufigkeit der Mutationsklassen in Nachkommenschaften aus nicht mutierten Blütenkörbchen*

| Versuchsnummer | Nicht mutierte Blütenkörbchen | Einfarbig mutierte Blütenkörbchen mit Sektoren | Vollständig einfarbig mutierte Blütenkörbchen | Gesprenkelt mutierte Blütenkörbchen mit Sektoren | Vollständig gesprenkelt mutierte Blütenkörbchen | Summe |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 101 G | 2980 | 23 | 4 | 3 | 133 | 3143 |
| 105 E | 3120 | 165 | 107 | 23 | 532 | 3947 |
| 110 A | 2986 | 42 | 62 | 12 | 207 | 3309 |
| 112 A | 2241 | 39 | 45 | 3 | 218 | 2546 |
| 113 C | 4088 | 2 | 0 | 0 | 1 | 4091 |
| 110 | 5975 | 3 | 20 | 0 | 0 | 5998 |
| Summe | 21390 | 274 | 238 | 41 | 1091 | 23034 |

Für einen Einfluß der früheren oder späteren Entwicklung eines Blütenkörbchens an der Pflanze auf die Mutationsrate liegen keine Hinweise vor. Eine vollständig gesprenkelte Pflanze (Nr. 109) brachte sowohl aus früheren als auch aus späten Körbchen eine nur unwesentlich differierende Zahl einfarbig mutierter Blütenkörbchen in der Nachkommenschaft, nämlich 171 einfarbige auf 2144 gesprenkelte aus dem früh entwickelten und 157 einfarbige auf 2196 gesprenkelte aus dem spät entwickelten Körbchen. Homogenität liegt mit $P = 34\%$ vor.

### *7. Pleiotrope Genwirkung*

Die bereits eingangs erwähnte, mit der Mutation gleichzeitig auftretende Erscheinung der Vergrößerung der mutierten Blütenteile, die besonders in Blütenkörbchen mit Sektoren (vgl. Abb. 1 und 2) auffällt, läßt sich auch statistisch erfassen.

Dazu wurden in 6 spaltenden Nachkommenschaften die Durchmesser der Blütenkörbchen — nach mutierten und nicht mutierten Pflanzen getrennt — gemessen. Wegen der starken Variabilität des Merkmals Blütenkörbchengröße ist nur das erste bis dritte Blütenkörbchen einer Pflanze unter vergleichbaren Bedingungen zur Messung herangezogen worden. Die statistische Prüfung wurde als $t$-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse nachfolgend zusammengestellt sind (Tabelle 5). Die Größenunterschiede sind signifikant, d. h. die mutierten Blütenkörbchen sind innerhalb einer Nachkommenschaft größer als die nicht mutierten.

Zur Klärung der Frage, ob dieser Unterschied auf einer Vergrößerung der Zellen oder auf einer gesteigerten Zellteilungsrate bei gleichbleibender Größe beruht, sind die Längen-Breiten-Indices von Zellen aus Zungenblüten aus dem nicht mutierten und aus dem mutierten Teil von Blütenkörbchen mit Sektoren gemessen worden.

Insgesamt wurde aus je 15 nicht mutierten und mutierten Zungen eine durchschnittliche Zahl von 26 bzw. 27 Zellen ausgemessen. Als Meßbereich diente die Strecke zwischen 2 Rippen

in der Mitte der Zungen. Der für die statistische Auswertung durchgeführte $t$-Test ergab einen Mittelwert ($M$) für nicht mutierte Zungen von $7{,}45 \pm 0{,}20$ und von $8{,}11 \pm 0{,}39$ für mutierte Zungen. Für die Differenz von 0,66 ist $t = 1{,}527$ und $P > 10\%$.

Der Unterschied zwischen den Zellgrößenindices mutierter und nicht mutierter Zungen ist also nicht signifikant. Weil andererseits – bei einer vorzugsweise sich vollziehenden Längsteilung der Zellen — mutierte Blütenkörbchen signifikant größer sind als nicht mutierte, folgt, daß die Zahl der Zellen sich vermehrt haben muß, die Zellteilungsrate also angestiegen ist.

Die beobachtete Blütenvergrößerung könnte durch ein besonderes mit den $g$-Allelen gekoppeltes Gen bedingt sein. Dann müßten aber stets die beiden gekoppelten Gene gleichzeitig mutieren, ein in einer derartigen Häufigkeit wie in unserem Material unwahrscheinlicher Vorgang. Außerdem wären bei Vorliegen einer Kopplung unter 16042 Blütenkörbchen mit mutierten Sektoren aus einer Gesamtzahl von etwa 130000 untersuchten Blütenkörbchen Austauschtypen zu erwarten gewesen, die zu denselben Typen von Blütenkörbchen führen würden, wie eine Mutation nur des einen der beiden miteinander gekoppelten Gene. Es müßten also Blütenkörbchen entstehen, deren mutierter Sektor der kleinere bzw. der nicht mutierte der größere wäre. Tatsächlich fanden sich drei Pflanzen mit je einem derartigen Blütenkörbchen. Da solche auf Entwicklungsstörungen beruhenden Blütenanomalien jedoch mehrfach zu beobachten waren, ohne daß eine Blütenfarbänderung sie begleitete, ist diesen drei Ausnahmen keine besondere Bedeutung beizulegen. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besteht in der Annahme einer pleiotropen Genwirkung. Sie ist die einfachere und wohl wahrscheinlichere, zumal pleiotrop wirkende, instabile Gene bei Pflanzen gar nicht selten sind, wie es z. B. die Untersuchungen der mutablen Maisloci (McClintock 1951, Stadler 1951) zeigen.

Tabelle 5. *Ergebnisse der Größenmessung an mutierten (a) und nicht mutierten (b) Blütenkörbchen*

| Versuchs-nummer | $n$ | $M$ | Differenz | Signifikanz der Differenz |
|---|---|---|---|---|
| 129 | 112 | a $127{,}5 \pm 0{,}96$ mm | 23,6 | $P < 1\%$ |
| | | b $103{,}9 \pm 0{,}95$ mm | | |
| 128 | 56 | a $111{,}5 \pm 2{,}01$ mm | 22,7 | $P < 1\%$ |
| | | b $88{,}8 \pm 1{,}25$ mm | | |
| 120 | 54 | a $101{,}2 \pm 1{,}36$ mm | 12,5 | $P < 1\%$ |
| | | b $88{,}7 \pm 1{,}41$ mm | | |
| 112C | 35 | a $86{,}2 \pm 3{,}14$ mm | 7,5 | $P < 5\%$ |
| | | b $78{,}7 \pm 1{,}13$ mm | | |
| 112F | 21 | a $88{,}8 \pm 1{,}62$ mm | 10,3 | $P < 1\%$ |
| | | b $78{,}4 \pm 1{,}30$ mm | | |
| 132 | 26 | a $88{,}1 \pm 1{,}80$ mm | 13,2 | $P < 1\%$ |
| | | b $74{,}4 \pm 1{,}06$ mm | | |

Indessen ist die Frage, ob es sich bei diesem Ereignis in der Asternblüte um eine echte Pleiotropie entsprechend der Definition Tulpules (1954) handelt, nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Unter echt pleiotrop wirkenden Genen sind nach diesem Autor solche zu verstehen, die entwicklungsgeschichtlich nicht miteinander zusammenhängende Vorgänge steuern. Ein solcher Zusammenhang ist in unserem Fall zunächst nicht erkennbar, doch weist Harte (1955) auf die Möglichkeit hin, daß sich bei genauerer Kenntnis der Genwirkung sehr wohl die Verknüpfung zweier scheinbar unabhängig voneinander verlaufender Vorgänge ergeben könnte. So gesehen würde es bisher aber keinen einzigen Fall einer echten Pleiotropie

geben. Immerhin könnte es sich bei den beiden in der Asternblüte ablaufenden Prozessen doch um eine echte pleiotrope Genwirkung handeln.

*8. Cytologische Untersuchungen*

Um einen möglichen Zusammenhang der beobachteten Mutationen mit Chromosomenaberrationen festzustellen, wurde die Meiosis von Pollenmutterzellen heterozygot mutierter Pflanzen insbesondere auf Translokationen und Inversionen hin in 107 Zellen mit Diakinesen, 168 Anaphase-I- und 112 Anaphase-II-Zellen untersucht. Zum Vergleich dienten 123 Zellen mit Diakinesen aus nicht mutierten Kontrollpflanzen.

In keiner der untersuchten Zellen aus den heterozygot mutierten Pflanzen wurden jedoch Anzeichen für Translokations- und Inversionsvorgänge, Viererringe und Brückenbildungen, beobachtet. Das gleiche Ergebnis hatten die Untersuchungen an den Kontrollpflanzen. Auch für das Vorkommen von Deletionen bzw Defizienzen fand sich kein Anhaltspunkt. Sollten aber dennoch bei weiterer Ausdehnung der Untersuchungen chromosomale Aberrationen nachzuweisen sein, so können sie sicher nicht als Ursache der am *g*-Locus von *Callistephus chinensis* bestehenden hohen Mutabilität in Frage kommen. Wenn aber auch gröbere Chromosomenumbauten als Ursache der Labilität in unserem Falle ausscheiden, so bleibt natürlich wie bei allen Mutationsprozessen die Möglichkeit kleinster, sublichtmikroskopischer Chromosomenumlagerungen bestehen.

Daß Chromosomenaberrationen tatsächlich die Instabilität eines Locus bedingen können, beweist am besten der von McCLINTOCK (1944) nachgewiesene Bruch-Fusions-Brücken-Zyklus am Mais, in dessen Verlauf durch Crossing-over zwischen einer normalen Chromatide und einer Chromatide mit einem duplizierten Segment außer einem acentrischen Fragment eine Chromatidbrücke entsteht, die nach Zerreißen und Wiederverheilung der gebrochenen Enden zu einem dicentrischen Chromosom führt, das in der nächsten Anaphase den Zyklus wieder einleitet. Dieser sich in aufeinanderfolgenden Teilungen mehrmals abspielende Vorgang hat wiederholte Umlagerungen der betroffenen Loci zur Folge, die dadurch mutabel werden und Mosaikbildungen veranlassen.

Auf Grund ihrer phänotypischen Manifestation lassen sich die *g*-Allele der Aster am ehesten mit den Allelen des *luteus*- und *A*-Locus des Mais vergleichen, da beide Loci autonom, d. h. ohne Gegenwart eines besonderen Aktivators, mutieren und multiple Allelenreihen bilden. Durch das Gen *luteus*, dessen verschiedene Allele nicht durch somatische Mutation, sondern durch Mutation in den Keimzellen entstehen, wird eine Scheckung der Blätter verursacht, während die *A*-Allele die Aleuron- und Pflanzenfarbe bestimmen und ebenfalls ein Mosaik entstehen lassen.

Die Instabilität in diesen und ähnlichen Fällen soll nach McCLINTOCK (1951) ihren Ursprung in Änderungen haben, die nicht die Gene selbst betreffen, sondern den Zustand der unmittelbaren Umgebung der betreffenden Loci, der sich infolge von Chromatinumlagerungen abändern kann. Damit ist die Mutabilität eines Locus also ein „Positionseffekt". In der Tat besteht zwischen dem Verhalten der mutablen Maisallele und dem bekannten Beispiel des *variegated*-Positionseffektes bei *Drosophila* (LEWIS 1950) eine weitgehende Parallele, worauf McCLINTOCK (1951) und GOLDSCHMIDT (1955) hinweisen. Die generelle Übereinstimmung von Genmutation und Positionseffekt geht soweit, daß lediglich ein einziger gravierender Unterschied übrigbleibt, nämlich das Fehlen sichtbarer Chromosomenumbauten bei einer Genmutation bzw. deren Vorhandensein bei einem

Positionseffekt. Goldschmidt (l. c.) glaubt daraus folgern zu können, daß auch Genmutationen Chromosomenumbauten seien, jedoch submikroskopischer Natur.

Wechselnde Ausprägungsgrade einer Variegation, die „Allele", können durch chromosomale Umbauten verschiedener Art und Größe, die jedesmal die Lage des Chromatins zum Locus verändern, verursacht sein, wie Hinton (1950) das sehr anschaulich zu zeigen vermochte: *Drosophila*männchen mit einer den Phänotyp des Auges modifizierenden Inversion wurden röntgenbestrahlt und in der Nachkommenschaft dann solche Individuen ausgelesen, deren Augenphänotyp in mannigfacher Weise wieder verändert war[1]. An Speicheldrüsenchromosomen solcher Tiere vorgenommene Untersuchungen ergaben, daß die Mehrzahl neue Chromosomenumlagerungen besaßen. Mit der Annahme eines Positionseffektes stände auch die von sehr schwacher über zunehmende Anthocyansprenkelung bis zu einem vollständig ausgefärbten Blütenkörbchen führende multiple Allelenreihe des *g*-Locus der Aster in Einklang, da die Lage des angrenzenden Eu- bzw. Heterochromatins über den Wirkungsgrad des Positionseffektes von schwach gesprenkelt bis voll ausgefärbt entscheiden würde.

Die als Änderung eines Gens interpretierbaren Mutationsvorgänge können also durchaus auch anderer Natur sein, doch gestattet es das vorliegende Material nicht, eine Entscheidung über die Ursache der Instabilität des *g*-Locus — Genmutation oder Positionseffekt — zu treffen.

## D. Untersuchungen über die Pigmente nicht mutierter und mutierter Blütenkörbchen

Auf Grund der im genetischen Experiment erhaltenen Ergebnisse durfte eine monogen bedingte Differenz der verschiedenen Mutationstypen in bestimmten Blütenfarbstoffen angenommen werden. Da die genetisch gleichen Mutationen in drei Farbgruppen, nämlich von gelb zu weiß, von lachs zu rosa und von stumpfblau zu leuchtendblau, also in anthocyanfreien und anthocyanhaltigen Blüten beobachtet wurden, war ein Unterschied im Flavon- oder Flavonolbereich zu vermuten. In bezug auf die Anthocyane wurde die Blütenfarbvererbung bei *Callistephus* bereits von Wit (1937) studiert. Die Befunde konnten, soweit sie für uns von Belang sind, bestätigt werden. Auch ein Flavonol wurde bereits (nach Reznik 1956, S. 60) nachgewiesen. Die vermuteten Differenzen zwischen mutierten und nicht mutierten Typen in unserem Material ließen sich nun tatsächlich an Hand papierchromatographischer Analysen feststellen.

### *1. Methode*

Zur papierchromatographischen Untersuchung dienten die folgenden Lösungsmittelgemische:

a) Zur Festlegung der *Rf*-Werte:
1. n-Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5, (BE);
2. Äthylessigester-Ameisensäure-Wasser, 10:2:3, (EA);
3. m-Kresol-Eisessig-Wasser, 50:2:48, (KE).

b) Zur Bestimmung der Anthocyanidine:
4. n-Butanol-2n HCl, 1:1, (BH);
5. Eisessig-konz. HCl-Wasser, 30:3:10, (Forestal, F);
6. m-Kresol-5,5n HCl-Eisessig, 1:1:1, (KH).

[1] Obwohl es sich hier um das Rückgängigmachen eines Positionseffektes handelt, ist das Prinzip ja dasselbe wie im Falle einer Auslösung.

Als Papier kam Schleicher u. Schüll, Nr. 2043a Mgl zur Verwendung.

Der Nachweis der Anthoxanthine war unter Zuhilfenahme von Sprühreagentien und Farbreaktionen in der Lösung möglich, die Reaktionen allgemeinerer und neuerdings auch spezifischer Art ergeben und somit die nähere Konstitutionsaufklärung der Farbstoffe ermöglichen. Im einzelnen wurden durchgeführt:

1. Reduktionsprobe mit Mg und HCl,
2. Reduktionsprobe mit Zn und HCl (nach EVEREST, zit. nach HÄNSEL und HÖRHAMMER (1954),
3. Berylliumacetat-HCl-Reaktion (nach BRUNE 1954 und 1955),
4. a: Zirkonium-Zitronensäure-Reaktion (HÖRHAMMER u. HÄNSEL 1953),
   b: Kupfer-Essigsäure- bzw. Cadmium-selenige Säure-Reaktion (NEU 1956),
5. Tetraphenyldiboroxyd-Reaktion (NEU 1956),
6. Diazo-Reaktion nach NEU (1957):
   a: Diazotiertes 4-Amino-3,6-dimethoxy-4′-nitro-azobenzol (Echtschwarzsalz K),
   b: Tetraazotiertes Di-o-anisidin (Echtblausalz B).

Schließlich bietet sich als ebenso einfache wie elegante Methode, zwischen Aglykon- und Glykosidform eines Flavonols zu unterscheiden, das Chromatographieren mit Wasser an.

War eine Reaktion nicht als Tüpfeltest oder Sprühtest durchführbar, wurde die Aufbereitung der zu prüfenden Substanzen nach HÄNSEL und HÖRHAMMER (1954) vorgenommen, zum Schluß die das Flavonol enthaltende Essigesterphase nochmals eingeengt und dann mit dem betreffenden Reagenz wieder aufgenommen.

Zum Vergleich standen authentische Proben von Quercetin und Quercitrin (Präparate der Firma C. Roth, Karlsruhe) zur Verfügung.

Alle verwendeten Chemikalien waren analysenrein. Die Nachweisreaktionen sind unter gleichen Bedingungen reproduzierbar.

## *2. Ergebnisse*

*a) Untersuchung der Anthocyane.* Einen wichtigen Anhaltspunkt für das Auftreten bestimmter Flavonole bieten die in den anthocyanhaltigen Blüten vorkommenden Anthocyane, da vielfach das Vorhandensein eines bestimmten Anthocyans mit dem seines strukturhomologen Flavonols verknüpft ist, wie es zahlreiche Untersuchungen ergaben (Übersicht bei REZNIK 1956). Die Anthocyane der Aster sind nach WIT (l. c.) das Cyanidin, das Delphinidin und das Pelargonidin, die sämtlich als 3-Glykosid und 3,5-Diglykosid vorhanden sein können.

Unsere Versuche beschränkten sich auf die Feststellung der *Rf*-Werte von Anthocyanen und Anthocyanidinen. Tabelle 6 bringt eine Zusammenstellung der aus den verschiedenen anthocyanhaltigen Blüten gewonnenen und auf Grund ihrer *Rf*-Werte als identisch zu bezeichnenden Anthocyane und Anthocyanidine im Vergleich mit den in der Literatur für die betreffenden Farbstoffe angegebenen *Rf*-Werten.

Die Übereinstimmung war im allgemeinen gut, nur der für das Pelargonidin-3-Glykosid gefundene *Rf*-Wert von 0,33 statt der in der Literatur angegebenen Zahlen 0,45 bzw. 0,60 zeigt eine erhebliche Abweichung. Ohne Zweifel handelt es sich aber bei der gefundenen Substanz um ein Pelargonidinglykosid; schon die allein für Pelargonidin charakteristische starke orange Fluoreszenz unter UV kann als eindeutiger Beweis gelten.

Dem Vergleich der mutierten und nicht mutierten Blüten ist zu entnehmen, daß sie dieselben Anthocyane enthalten. Die Mutation scheint demnach auf die Anthocyane ohne Einfluß zu bleiben.

*b) Untersuchung der Flavonole.* Die strukturhomologen Flavonole sind für das Cyanidin das Quercetin, für das Pelargonidin das Kämpferol und für das Delphinidin das Myricetin. Nach den bisherigen Beobachtungen ist also das Vorkommen dieser drei Flavonole denkbar.

Tabelle 6. *Vergleich der Rf-Werte der Anthocyane und Anthocyanidine*

| Aglykone | | | 3-Glykosid BE | 3,5-Di-glykosid BE | Vorkommen in Blütenfarben | Vermutetes Anthocyan |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F | BH | KH | | | | |
| a 0,46 | 0,63 | — | 0,30 | 0,25 | rosa, lachs, | Cyanidin |
| b 0,50 | 0,69 | — | 0,37 | 0,15 | stumpfblau, | |
| c 0,48 | 0,65 | — | 0,40[1] | 0,28 | leuchtendblau | |
| a 0,65 | 0,75 | 0,84 | 0,33 | 0,29 | rosa, lachs | Pelargonidin |
| b 0,68 | 0,80 | 0,82 | 0,60 | 0,37 | | |
| 0,68[2] | — | — | 0,45[3] | 0,36 | | |
| a 0,28 | 0,31 | — | 0,21 | 0,14 | stumpfblau, | Delphinidin |
| b 0,30 | 0,35 | — | 0,16 | 0,10 | leuchtendblau | |
| c 0,30 | 0,32 | — | 0,25[1] | 0,17 | | |

— = nicht durchgeführt oder in der Literatur nicht angegeben, a = eigene Werte, b = Bate-Smith, c = Seyffert, [1] = Abe und Hayashi, [2] = Harborne, [3] = Reznik.

Im Laufe der Untersuchungen gelangten wir zu folgenden Resultaten:

1. Papierchromatogramme mit den Lösungsmitteln EA und KE wiesen von allen Blütenfarben je zwei gut differenzierte Anthoxanthinflecken auf, mit BE meistens nur einen. Die gefundenen *Rf*-Werte — dazu wurden einerseits die Werte aus gelben, lachsfarbenen und stumpfblauen, d. h. aus nicht mutierten Blüten vereinigt, und die aus weißen, rosa und leuchtendblauen, d. h. mutierten Blüten andererseits, da die *Rf*-Werte innerhalb dieser beiden Gruppen sehr gut übereinstimmten — sind die folgenden: für nicht mutierte Blüten in BE 0,72, in EA 0,69 bzw. 0,76 und in KE 0,29 bzw. 0,61; in mutierten Blüten in BE 0,60, in EA 0,71 bzw. 0,74 und in KE 0,43 bzw. 0,75. Es sind also offenbar in den beiden Blütentypen nur zwei Anthoxanthine realisiert.

2. Die Mg-HCl-Reduktion ergab in allen Fällen eine eindeutige Rotfärbung, so daß auf das Vorliegen von Flavonolen geschlossen werden kann.

3. a) Der für Flavonolaglykone und -glykoside charakteristische Unterschied war beim Chromatographieren mit Wasser zu beobachten. Die zu prüfenden Stoffe aus mutierten Blüten liefen eine Strecke mit, während der *Rf*-Wert der Substanzen aus nicht mutierten Blüten 0,0 betrug. Nach saurer Hydrolyse hatten auch die ersten einen *Rf*-Wert von 0,0. Sie müssen demnach vorher Glykosidcharakter gehabt haben.

b) Die Zn-HCl-Reduktion verlief im Reagenzglas und als Tüpfeltest auf dem Papier positiv. Nicht mutierte Blüten behielten die gelbliche Eigenfärbung bei bzw. zeigten auf dem Papier eine schwache gelbliche HCl-Färbung; mutierte Blüten färbten sich dagegen rot an. Da mit dem Vorhandensein eines Flavanonols das gleichfalls Rotfärbung hervorruft, kaum zu rechnen ist, darf das Ergebnis wohl als Bestätigung des in 3a erhaltenen aufgefaßt werden.

c) Beryllium-HCl-Test: Nicht mutierte Blüten entfärbten sich nicht nach Zufügen von 0,1 n HCl, wohl aber mutierte. Die unter UV gelbgrüne Fluoreszenz verschwand nach Besprühen mit 2 n HCl in beiden Blütentypen, wie es bei Vorliegen freier Flavonole (Aglykone) zu erwarten ist.

d) Die nach Behandlung mit Zirkonoxychlorid aufgetretene Gelbfärbung in nicht mutierten und mutierten Blüten verschwand nach Besprühen mit Zitronensäurelösung bei den letzten, blieb aber bei nicht mutierten Blüten erhalten. Dieses

Resultat entspricht also den vorherigen. Auf die hierher gehörige Kupfer-II-acetat-Essigsäure-Reaktion wurde im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet, da mehrmalige Versuche, sie als Tüpfeltest durchzuführen, keine eindeutigen Ergebnisse brachten.

Aus den vorstehenden Resultaten läßt sich zunächst folgern, daß nicht mutierte Blütenkörbchen die Flavonole wahrscheinlich als Aglykone, mutierte dagegen als Glykoside, und zwar in Form von 3-Glykosiden, enthalten. Die beiden verschiedenen Flavonole sind in derselben Blüte offensichtlich entweder als Aglykone oder als 3-Glykoside vorhanden. Auf Grund der *Rf*-Werte werden die Flavonolaglykone Quercetin und Kämpferol in nicht mutierten Blüten sowie ein Quercetin-3-Glykosid und ein Kämpferol-3-Glykosid in mutierten Blüten vermutet. Ein Vergleich der gefundenen *Rf*-Werte mit den für die betreffenden Flavonole angegebenen Literaturwerten zeigt im allgemeinen gute Übereinstimmung (Tabelle 7).

Tabelle 7. *Rf-Werte der Flavonole*

| Blütentyp | BE | EA | | KE | | Flavonole | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nicht mutiert | a 0,72<br>b 0,75<br>0,73[2] | 0,69<br>0,71[1] | 0,76<br>0,80[1] | 0,29<br>0,27 | 0,61<br>0,61 | Quercetin | Kämpferol |
| Mutiert . . . | a 0,60<br>b 0,68 | 0,71<br>0,58[1] | 0,74<br>0,69[1] | 0,43<br>0,42 | 0,75<br>0,72 | Quercetin-3-Glykosid | Kämpferol-3-Glykosid |

a = eigene Werte, b = BATE-SMITH, [1] = REZNIK, [2] = authentische Vergleichsprobe von Quercetin.

4. Für die in Frage kommenden Flavonolaglykone gibt NEU (1956) die folgenden Farbreaktionen mit Tetraphenyldiboroxyd in Tageslicht (T) bzw. unter Ultraviolett (UV) an; für Quercetin gelborange (T) bzw. gelborange (UV) und für Kämpferol gelb (T) bzw. gelbgrün (UV). Die im Experiment erhaltenen Farbreaktionen entsprachen diesen Angaben.

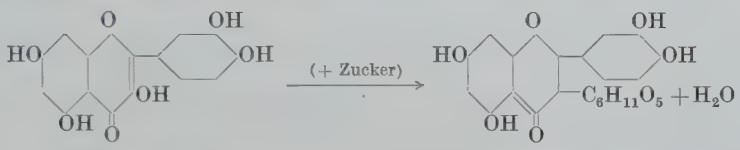
5. Mit den Diazoniumsalzen Echtschwarzsalz K und Echtblausalz B sind nach NEU (1957) folgende Farbreaktionen zu erwarten: mit K für Quercetin gelb (gelbgrau) (T) bzw. gelbgrün (UV) und für Kämpferol grün (T) bzw. grün (UV), mit B für Quercetin rotviolett (T) bzw. blau (UV) und für Kämpferol rotviolett (T) bzw. braun (UV). Die Reaktion der aus unserem Material gewonnenen freien Flavonole entsprach im Tageslicht den Angaben für beide Salze, unter UV denen für Echtschwarzsalz K und denen für Echtblausalz B für Kämpferol. Dagegen wich die mit Echtblausalz B gebildete Farbe unter UV von der für Quercetin erwarteten ab. Genau so verhielt sich aber die im übrigen mit der gefundenen Substanz übereinstimmende Vergleichsprobe Quercetin, so daß diesem Unterschied wohl keine Bedeutung zukommt.

Offen bleibt einstweilen die Frage nach der Konstitution der Flavonolglykoside. Auf Grund der *Rf*-Werte wären Isoquercitrin und Kämpferitrin denkbar. Quercitrin scheidet als mögliches Quercetin-3-Glykosid aus, weil die Vergleichsprobe Quercitrin in *Rf*-Werten und Farbreaktionen erheblich mit der gefundenen Substanz differierte. Die Farbreaktionen mit Tetraphenyldiboroxyd und den Diazosalzen erlauben wegen der noch nicht vollständigen Erfassung von Quercetin- und Kämpferol-3-Glykosiden in der Literatur kein abschließendes Urteil.

Wir fanden die folgenden Farben: mit Tetraphenyldiboroxyd für Q-3-Glykosid gelborange (T) und gelborange (UV), für K-3-Glykosid gelblich (T) und schwach gelborange (UV), mit Echtschwarzsalz K für Q-3-Glykosid gelbbraun (T) und gelb (UV), für K-3-Glykosid grau (T) und oliv (UV), mit Echtblausalz B für Q-3-Glykosid rotviolett (T) und gelbbraun (UV), für K-3-Glykosid rotviolett (T) und bräunlich (UV).

Es darf daher mit sehr großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die in den Blüten des von uns untersuchten Asternmaterials vorhandenen Flavonole tatsächlich Quercetin und Kämpferol bzw. ein Quercetin-3-Glykosid und ein Kämpferol-3-Glykosid sind. Ein Hinweis auf Myricetin und ein Myricetinglykosid konnte in keinem Fall erhalten werden.

Die durch die Mutation hervorgerufene Blütenfarbänderung findet damit eine einfache Erklärung. Das rezessive, nicht mutierte Allel bedingt die Produktion der beiden Flavonole als Aglykone, das dominante, mutierte Allel deren Ausbildung zum 3-Glykosid. Demnach handelt es sich um eine einfache, von einem Gen abhängige Anlagerung eines Zuckers in der $C_3$-Stellung des Flavonolmoleküls unter Freisetzung eines Moleküls $H_2O$, wie es die Formel verdeutlicht:




Quercetin — Quercetin-3-Glykosid

In der Diskussion um die Flavonoidsynthese hat sich allgemein die Hypothese der unabhängigen Entstehung von Flavonolen und Anthocyanen aus einer gemeinsamen Vorstufe durchgesetzt. In neueren Arbeiten wurde dies von Jörgensen und Geissmann (1955) bei *Antirrhinum*, von Seyffert (1955) bei *Cyclamen* und von Reznik (1956) für die Laubblattpigmentierung dargelegt. Der von uns beschriebene Fall kann als weiteres, indirektes Argument zugunsten dieser Hypothese gelten. Analog den bei Anthocyanen bekannten Verhältnissen besteht die Möglichkeit eines einfachen Umbaues im Flavonolmolekül, wobei auch die kompliziertere Molekülstruktur über die einfachere dominiert. Hänsel und Hörhammer (1954) fanden bei *Betula* ein ähnliches Beispiel. Myricitrin (ein 3,5,7,3′,4′,5′,-Hexaoxyflavon-3′-Rhamnosid) dominiert über Hyperosid (ein 3,5,7,3′,4′,-Pentaoxyflavon-3-D-galaktosid). Allerdings ist in diesem Fall mit dem Wechsel von dominant zu rezessiv eine Änderung der Glykosidform (Rhamnose → Galaktose) verknüpft. Außerdem lassen sich beide Flavonole nicht durch einen einzigen Reaktionsschritt ineinander überführen. Demgegenüber ist die Blütenfarbmutation von *Callistephus*, durch die die Glykosidierung eines freien Flavonols erfolgt, anscheinend das bisher einzige Beispiel einer monogen bedingten Strukturänderung innerhalb eines Flavonolmoleküls. Flavonole sind also offenbar in ihrem Reaktionsvermögen ebenso selbständig wie die Anthocyane.

Hinzugefügt sei ferner, daß außer den bei blauen Asterblüten abstumpfend wirkenden, bisher besprochenen *g*-Allelen noch ein besonderes Allelenpaar *L*/*l* für leuchtende bzw. stumpfe Blütenfarbe vorkommt, das über die *g*-Allele epistatisch ist. In Kreuzungen blauer Blütenkörbchen mit Flavonolfaktor (*Gg*)×

blauen Körbchen mit Stumpffaktor (*Ll*) wurde nämlich in der $F_2$ eine normale dihybride Spaltung erhalten, bestehend aus 9 leuchtendfarbigen mit Flavonolglykosid : 3 leuchtendfarbigen mit Flavonolaglykon : 3 stumpffarbigen mit Flavonolglykosid : 1 stumpffarbigen mit Flavonolaglykon Phänotypen.

## Summary

The origin and behaviour of a mutable flower-color gene of the china aster is described. The *g*-locus examined is autonomous; it produces a series of alleles leading from unmutated, recessive ($g_0$-allele) via different speckled grades ($g_1$—$g_4$-alleles) to uniformly colored, dominant (*G*-allele). This last state seems to be stable.

The principal direction of mutation goes from recessive to dominant; back-mutations, i. e. in direction to the recessive $g_0$-allele, were observed only among the mutable speckled alleles. The mutation arises in soma and depending on the time of its origin may result in complete or partial changed plants. Changes from $g_0$ to $g_1$—$g_4$ predominate early in development; that from $g_0$ to *G* comes steady to pass during plant development.

A correlation between grade of mutation of parent flowerhead and mutability of offspring only could be confirmed if the whole plant showed the mutated character.

The increase of flowers being connected with the color change is considered a pleiotropic gene action.

Cytological observations did not show any chromosomal aberrations. The relation between gene mutation and position effect is discussed.

By this mutation the flower phenotype is changed from yellow to white or from salmon to rose resp. from weak to bright blue. Anthocyanins remain unchanged, not so the flavonols. Recessive, unmutated flowers contain two flavonolaglycones, presumably quercetine and kaempferole; the dominant, mutated flowers have the same flavonoles as 3-glycosides. Therefore this mutation process is a simple structural change of a flavonole molecule depending on a single gene.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. KAPPERT, danke ich aufrichtig für das mir überlassene Thema und für die mir während der Arbeit zuteil gewordene Förderung.

## Literatur

ABE, Y., and K. HAYASHI: Further studies on paperchromatography of anthocyanins involving an examination of glycoside types by partial hydrolysis. Studies on anthocyanins. XXIX. Bot. Mag. (Tokyo) **69**, 577—587 (1956). — BATE-SMITH, E. C.: Paperchromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. Nature (Lond.) **161**, 835 (1948). — BAUR, E.: Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. Berlin: Gebrüder Borntträger 1911. — Mutationen von *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **19**, 117—193 (1918). — BENL, G.: Über ein pleiotropes, labiles Gen bei *Petunia nyctaginiflora*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 86—92 (1949). — BRINK, R. A.: Very light variegated pericarp in maize. Genetics **39**, 724—740 (1954). — BRUNE, W.: Über Farbreaktionen von Flavonoiden mit Berylliumionen. Naturwiss. **41**, 373—374 (1954). — Vergleichende Untersuchungen über Flavonstrukturen durch Bildung einiger Metallkomplexe. Arch. Pharm. (Weinheim) **288** (60), 205 (1955). — DEMEREC, M.: Behaviour of two mutable genes of *Delphinium ajacis*. J. Genet. **24**, 179—193 (1931). — EMERSON, R. A.: Genetical studies on variegated pericarp in maize. Genetics **2**, 1—35 (1917). — The frequency of somatic mutation in variegated pericarp in maize. Genetics **14**, 488—511 (1929). — GOLDSCHMIDT,

R. B.: Theoretical Genetics. Berkeley and Los Angeles: University of California Press 1955. — Gustafsson, Å., u. D. v. Wettstein: Mutationen und Mutationszüchtung. In: Handbuch der Pflanzenzüchtung. 2. Aufl. herausgeg. von H. Kappert u. W. Rudorf, Bd. 1. Berlin u. Hamburg: Paul Parey 1958. — Hänsel, R., u. R. Hörhammer: Vergleichende Untersuchungen über die Flavonglykoside der Betulaceen. Arch. Pharm. (Weinheim) **287**, (59) 117—126 (1954). — Harborne, J. B.: Flavonoids of the Primulaceae: Anthocyanidins of the Primulaceae. Nature (Lond.) **181**, 25—27 (1958). — Harte, C.: Untersuchungen über labile Gene. I. Mitt. Selektionsversuche an *Antirrhinum majus mut. fimbriata*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 392—413 (1951). — Genetik der Samenpflanzen. In: Fortschritte der Botanik, Bd. 17. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Hinton, T.: A correlation of phenotypic changes and chromosomal rearrangements at the two ends of an inversion. Genetics **35**, 188—205 (1950). — Hörhammer, R., u. R. Hänsel: Zur Analytik der Flavone. II. Über das Komplexbildungsvermögen einiger Oxyflavone und die Konstitution des in *Polygonum hydropiper* L. vorkommenden Rhamnazinesters. Arch. Pharm. (Weinheim) **287**, (58) 425 (1953). — Imai, Y.: Studies on yellow-inconstant, a mutating character of *Pharbitis nil*. J. Genet. **22**, 191—200 (1930). — Jörgensen, E. C., and T. A. Geissmann: The chemistry of flower pigmentation on *Antirrhinum majus* color genotypes. III. Relative anthocyanin and aurone concentrations. Arch. Biochem. **55**, 389—402 (1955). — Kappert, H.: Die vererbungswissenschaftlichen Grundlagen der Züchtung, 2. Aufl. Berlin u. Hamburg: Paul Parey 1953. — Lawrence, W. J. C., and R. Scott-Moncrieff: The genetics and chemistry of flower color in *Dahlia*. A new theory of specific pigmentation. J. Genet. **30**, 155—226 (1935). — Lewis, E. B.: The phenomenon of position effect. Advanc. Genet. **3**, 73—115 (1950). — McClintock, B.: The relation of homozygous deficiencies to mutation and allelic series in maize. Genetics **29**, 478—502 (1944). — Chromosome organization and genic expression. Cold Spr. Harb. Symp. qant. Biol. **16**, 13—48 (1951). — Neu, R.: Über die Unterscheidung zwischen Flavonglykosiden und Flavonen. VI. Mitt. Analytische Arbeiten auf dem Flavongebiet. Z. analyt. Chem. **153**, 95—104 (1956). — Aromatische Borsäuren als bathochrome Reagentien für Flavone. Analytische Untersuchungen auf dem Flavongebiet. VIII. Mitt. Z. analyt. Chem. **151**, 328—332 (1956). — Der Nachweis von Flavonen und ihrer Abbauprodukte mit stabilen Diazoniumsalzen durch Tüpfelreaktionen. Mikrochim. Acta, 196—214 (1957). — Peterson, P. A.: A mutable pale-green locus in maize. Genetics **38**, 682 (1953) (Abstr.). — Reznik, H.: Untersuchungen über die physiologischen Bedeutung der chymochromen Farbstoffe. S.-B. heidelb. Akad. Wis., math.-nat. Kl., 2. Abh., 125—217 (1956). — Rhoades, M. M.: Effect of the Dt-gene on the mutability of the $a_1$-allele in maize. Genetics **23**, 377—398 (1938). — Seyffert, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen von *Cyclamen*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 311—334 (1955). — Smith, H. H., and S. A. Sand: Genetic studies on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana sanderae* and *N. langsdorffii*. Genetics **42**, 560—582 (1957). — Stadler, L. J.: Spontaneous mutation at the R-Locus in maize. I. The aleuron-color and plant-color effect. Genetics **31**, 377—394 (1946). — Spontaneous mutation in maize. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 49—64 (1951). — Stubbe, H.: Genmutation. I. Allgemeiner Teil. In: Handbuch der Vererbungswissenschaft, Bd. IIF. Berlin: Gebrüder Bornträger 1938. — Tulpule, S. H.: A study of pleiotropic genes in maize. Amer. J. Bot. **41**, 294—301 (1954). — Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1956. — Wit, F.: Contributions to the genetics of the china aster. Genetica **19**, 1—104 (1937).

Dr. Walter Hondelmann, Forschungsstelle für Kulturpflanzenzüchtung der Max-Planck-Gesellschaft, Hamburg-Volksdorf, Waldredder 4

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 182—189 (1959)

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan

# SELECTION OF FITTER TYPE NUCLEI IN HETEROCARYONS OF *ASPERGILLUS ORYZAE*

By

Kazuyoshi Kiritani

With 4 Figures in the Text

*(Received January 12, 1959)*

It is of interest to study how a mutant in a natural population of microorganisms is selected for or against by environmental conditions; a number of papers have already been published in this field. Because of the importance of this kind of work in the fermentation industry of Japan where Koji molds play an important role, a study of the fate of fitter types which arise spontaneously in a large population of *Aspergillus oryzae* was undertaken. For this purpose a heterocaryon was made between a fitter type and a less fit strain, and the dynamic shift in ratio of the two kinds of nuclei during the growth of the heterocaryon was studied by changing environmental conditions.

## Material and Methods

### *Strains*

Two auxotrophic mutants of *Asp. oryzae*, *y lys f* (yellow, lysine-less, less fit for casein medium) and *w leu f* (white, leucine-less, less fit for casein medium), were used as starting materials. A fast grower which was secured from the hyphal frontier of *y lys f* will be referred as the fitter type, *y lys F*. Prototrophic heterocaryons were produced between these strains by Sermonti's limiting-supplement method (1954), and were maintained on minimal slants.

### *Media*

Fries No. 3 medium, used as minimal medium (M. M.), has the following composition:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glucose | 15 g | NaCl | 0.1 |
| $NH_4$-tartrate | 5 | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.1 |
| $NH_4NO_3$ | 1 | Trace element solution | 1 ml |
| $KH_2PO_4$ | 1 | Distilled water | 1000 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | Agar | 15 g |

The medium was, whenever necessary, supplemented with 200 mg of L-lysine and/or L-leucine per liter. The media supplemented with either lysine or leucine, or both, will be abbreviated as $Lys^+$, $Leu^+$, and $L^+L^+$, respectively. Casein medium (C medium) and casamino acid medium (CA medium) consist of the following components:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glucose | 15 g | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 10 mg |
| $KH_2PO_4$ | 1 | Casein purified | 4 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | or Casamino acid (Vitamin free) | 4.56 |
| NaCl | 0.1 | Distilled water | 1000 ml |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.1 | Agar | 15 g |

Medium was sterilized by autoclaving for 10 min at 15 pounds in a large flask and divided into small volumes by pipetting as needed. When casein was employed as the essential N source it was difficult to divide the material equally into small lots because of the coagulation of the protein by heating, although the flask was shaken well to make the protein distributed homogeneously in the medium. The casein and casamino acid media were not supplemented with L-lysine and L-leucine unless otherwise mentioned.

### *Determination of optimal concentrations of casein and casamino acid*

Adequate dosages of casein and casamino acid in the media were determined by letting the test strains grow on media containing different amounts of these nutrients and comparing the diameters of the resulting giant colonies. Both *y lys f* and *w leu f* strains grew thinly on N-free medium and the diameter increased at a rate of about 0.4 mm per hour. With an increase in the concentration of casamino acid in the medium, the growth rate of the colony diameter was accelerated linearly until it reached 0.6 mm per hour. The addition of casein was not effective in increasing the growth rate, but colonies of both strains became thick and heavy as the concentration was increased. When the casamino acid in the medium reached the level of 4.56 g per liter, the growth curves of both strains approached a plateau. This amount of casamino acid (4.56 g) can be produced from 4 g casein by acid hydrolysis (Yoshida and Narita 1954).

### *Determination of growth rate*

As it was found to be convenient for the present purpose to use the growth tube designed by Ryan et al. (1943), the growth rate as well as the selection of fitter type nuclei during the course of propagation were studied in this way. Since the growth of *Asp. oryzae* is generally slower than that of *Neurospora crassa*, it takes about 1 month for the hyphae to cover the whole length of a growth tube. For the purpose of increasing oxygen availability, growth tubes having 7 chimneys at intervals of 5 cm were utilized (Fig. 1). This type of growth tube will be called a "chimney tube". The 30 cm tubes received 20 ml of agar medium and were then set to harden so as to have equal thickness at every point.

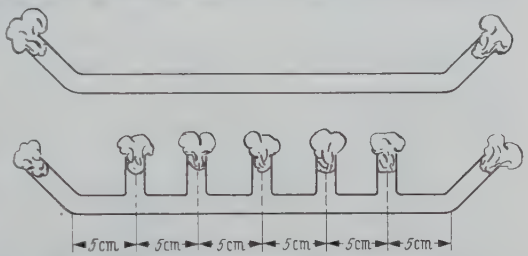


Fig. 1. The growth tube and the chimney tube

Conidia and hyphae were inoculated from 3 to 7 day old slant cultures. When a heterocaryotic hyphal mat was used as the inoculum, the hyphae were inoculated in the center of a minimal agar plate and allowed to grow for 4 to 5 days. When the diameter of the colony had reached 3 to 6 cm, about $1.0 \times 1.6$ cm square of the hyphal mat was cut from the periphery of the colony and used as the inoculum for the growth tube. As a general procedure, the distance between the starting point and the frontier of hyphal growth was measured every 2 to 4 days. In general, the growth distance increased proportionally with time, and thus the rate of growth (cm per hour) was determined from the linear portion of the growth curve. These experiments were carried out at 30° C.

### *Determination of conidial frequency*

From fully-grown colonies in growth or chimney tubes, 1 cm pieces of hyphal mat on agar blocks were cut out at various points and transferred to petri dishes. The conidia were immediately washed from the mats with 10 ml of sterile saline having a $10^{-4}$ dilution of lauril sulfonic acid as a wetting agent. This was filtered through a Kaburagi No. 2 glass filter to remove hyphal fragments, then sucked up and blown out over 100 times with a blower pipette to separate the conidia. The resultant suspension usually included about 20 per cent of chained conidia, inseparable by further mechanical treatment. Fortunately, the percentage of the chained conidia was about the same in all strains, so that this factor was not serious. From 0.05 to 0.2 ml of conidial suspensions in suitable dilutions were plated onto M. M., $Lys^+$, $Leu^+$ and $L^+L^+$. The media included 200 mg of neutral red per liter which was added to limit the growth of the colony; without this it becomes impossible to count above 50 colonies after 48 hours incubation. The neutral red in the media does not suppress the germination of conidia ($P < 0.05$).

Calculation of frequencies of the 3 types of conidia derived from heterocaryotic growth was made from the average number of colonies on triplicate plates of differential media (Prout, Huebschman, Levene and Ryan 1953; Atwood and Mukai 1955).

## Experimental results

### *Isolation of fitter type*

As it was expected that a fitter type would grow as fast on C medium as on CA medium, by transforming casein into casamino acid with its protease, hyphae of *y lys f* and *w leu f* were inoculated onto C agar or CA agar in four growth tubes of each. The rates of growth of the two strains are 0.21 to 0.23 mm per hour on C agar and 0.26 to 0.33 mm per hour on CA agar in the steady state. In all tubes of C media but one the mutants grew throughout at the ordinary rate. The *y lys f* in one tube grew throughout at a rate of 0.34 mm per hour, which exceeded even the rate on CA agar. This faster grower showed relatively thin growth, slender and high hyphae on every medium. Other characters of this strain are that it forms tiny conidia on C medium only, and it clarifies casein completely, though clarification under the hyphae takes about 7 days. This mutant was named *F* (fitter type), as distinguished from *f* (less fit type). The $p_H$ of the C medium after growth was completed was 6.2 for *F* and 5.4 for *f*.

Another mutant, $f_h$, isolated in the same way, has the morphology of *F*, but the ordinary rate of growth on C agar. Table 1 represents the rates of growth and conidial formation of these types on various media.

Table 1. *Rate of growth and conidiation of y lys mutants on various media*

| Media | Using | *y lys F* | | *y lys* $f_h$ | | *y lys f* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Rate of growth (mm/hr) | Conidiation | Rate of growth (mm/hr) | Conidiation | Rate of growth (mm/hr) | Conidiation |
| Complete | petri dish | 0.89 | — | 0.62 | + | 0.85 | +++ |
| Casamino acid | petri dish | 0.56 | ± | 0.58 | +++ | 0.56 | +++ |
| | growth tube | 0.27 | ++ | | | 0.26—0.33 | +++ |
| Casein medium supplemented with 200 mg lysine/liter | petri dish | 0.56 | — | | | | |
| | growth tube | 0.28 | ++ | | | 0.26—0.27 | ++ |
| Casein | petri dish | 0.65 | — | 0.038 | ? | 0.23 | ++ |
| | growth tube | 0.33—0.36 | ++ | 0.23 | + | 0.21—0.23 | ++ |
| $Lys^+$ | petri dish | 0.63 | ± | 0.52 | ++ | 0.51 | +++ |

—, No conidiation; ±, +, ++, +++, degree of conidiation determined by naked eye.
?, The growth was not enough for conidiation. The data represent the average of at least duplicate plates or tubes.

### *Proof of nuclear site of F factor*

It was necessary to examine whether the *F* strain is controlled by a nuclear gene or a cytoplasmic factor. Conidia from the heterocaryon between *y lys F* and *w leu f* were streaked on a $Lys^+$ agar plate. The resultant single colonies were isolated, tested for their requirement for lysine, and were observed for morphology and the degree of dissolution of casein on C medium in small tubes. None of the *lys* had altered their *F* character through the heterocaryotic condition. The *leu* colonies segregated from the heterocaryon on a $Leu^+$ agar plate exhibited white color of conidia and inherited the same ability of casein dissolution as the *leu* parent. Therefore, we can conclude that the mutation to *F* occured in the nucleus and was not due to any change in a cytoplasmic factor.

*Shift of the proportion of fitter type nuclei in heterocaryons*

The next problem was to determine what kind of selection will occur in heterocaryons during growth in growth tubes. We may surmise that a faster

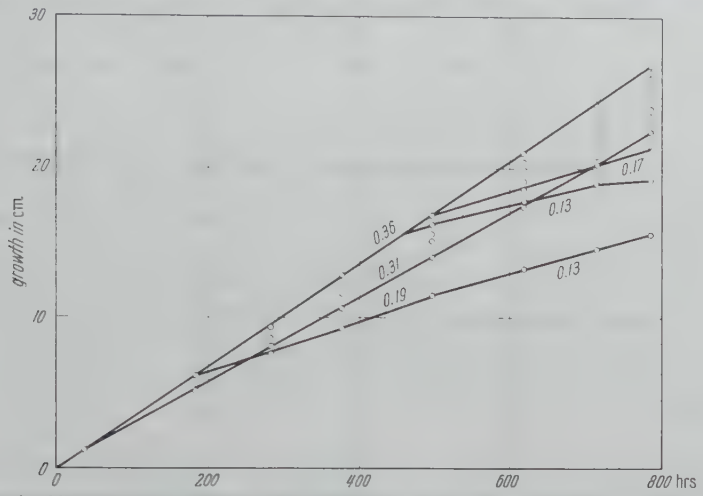



Fig. 2. Growth of heterocaryon between *y lys F* and *w leu f* on casein medium in growth tube. Numbers show rate of growth in mm per hour

grower segregating from the heterocaryon should have a selective advantage over a slow grower, since the hyphae of a slow grower will be left behind.

**1. On C medium in growth tubes.** The growth curve of the heterocaryon on C medium is shown in Fig. 2. Slender hyphae, like those of the *F* type, reached 17 to 21 cm in length after 600 hours and the hyphal tips formed a straight across the tube. The rates of growth were 0.33 to 0.36 mm per hour in each of 13 tubes until about 200 hours, then the rates in tubes No. 1, 4, 6 and 7 were reduced to 0.13 or 0.17 mm per hour as they approached the ends of the tubes. The color of conidia in these tubes was light brown and it was hard to distinguish the white *leu* conidia existing on heterocaryotic hyphae. The "slow down" could be reconstructed artificially using growth tubes, both mouths of which were closed with rubber stoppers during the first 200 to 400 hours, as shown in Fig. 3. Under these conditions the fungi use up the oxygen in the tube rapidly and stop growing after 3 or 4 days incubation. The rubber stoppers

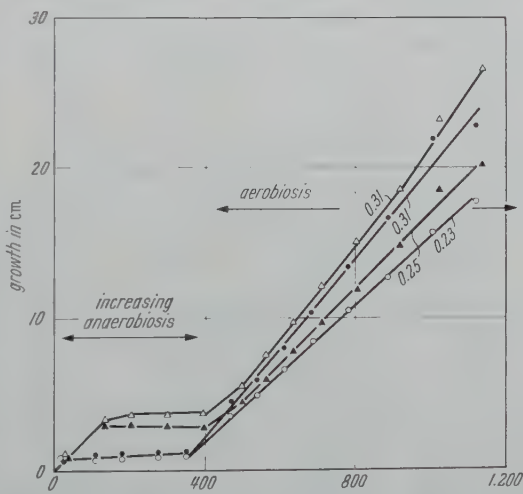



Fig. 3. Rate of growth of the heterocaryon between *y lys F* and *w leu f* under anaerobic and aerobic conditions on casein medium. Numbers show rate of growth in mm per hour

were then changed to cotton plugs and growth was allowed to continue for about 600 hours more; the fungi never reached the original rate of growth, although they speeded up.

The ratio of conidial frequencies examined at various points of growth in the tubes altered very much as the growth advanced (Table 2). In general, conidiation became worse as growth proceeded, especially in tubes No. 1 and 3. As no conidia were formed on the front regions of hyphae in these tubes, the hyphal mats were cultivated on C agar plates for 7 days and conidia from the old hyphae were harvested. The *leu* conidia comprised about 60 to 90 per cent on the original mat, reduced rapidly in number as the hyphae grew, and finally disappeared altogether. This does not, however, mean complete elimination of the *leu* nuclei in the hyphae. When hyphal mats from the front regions of tubes No. 1, 2, 3 and 4 from which no *leu* conidia had been collected were transferred onto M. M. or Leu$^+$ agar plates, there were some parts around the mat capable of growing after 48 hours incubation. In the most extreme case, it was observed that the 51.5 per cent of *leu* conidia remained at the 25 to 26 cm front region of the hyphae in the No. 3 tube.

Table 2. *Rate of growth and conidial frequencies of the heterocaryon between y lys F and w leu f which had been grown on casein medium in growth tubes*

| Tube No. | Rate of growth (mm/hr) | Region* from which conidia were harvested (cm of growth) | Number of viable conidia per ml | Percent of conidial types | | | Growth of transferred hyphal mat on Leu$^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | heterocaryon | *y lys F* | *w leu f* | |
| 1 | 0.36 | −1—0 | $8.8 \times 10^5$ | 14.0 | 3.0 | 83.0 | |
| | ↓ | 1—2 | $3.4 \times 10^4$ | 8.4 | 15.6 | 76.0 | |
| | | 14—15 | $5.4 \times 10^{4}$** | $<0.1$ | $>99.8$ | $<0.1$ | |
| | 0.13 | 15—16 | — | — | — | — | + |
| 2 | 0.36 | −1—0 | $7.7 \times 10^5$ | 18.2 | 19.3 | 62.5 | |
| | | 1—2 | $1.2 \times 10^3$ | $<0.1$ | 70.2 | 29.8 | |
| | | 26—27 | — | — | — | — | + |
| 3 | 0.36 | −1—0 | $2.6 \times 10^5$ | 19.3 | 11.7 | 69.0 | |
| | | 24—25 | — | — | — | — | + |
| | | 25—26 | $1.0 \times 10^{4}$** | 1.0 | 47.5 | 51.5 | |
| 4 | 0.36 | −1—0 | $3.0 \times 10^5$ | 5.9 | 2.5 | 91.6 | |
| | ↓ | 15—16 | $1.1 \times 10^3$ | 2.0 | 89.0 | 9.0 | |
| | | 22—23 | $3.6 \times 10^2$ | $<1$ | $>98$ | $<1$ | |
| | 0.17 | 22—23 | — | — | — | — | + |
| 5 | 0.36 | −1—0 | $3.5 \times 10^5$ | 11.4 | 8.6 | 80.0 | |
| | | 1—2 | $8.1 \times 10^3$ | 1.9 | 78.7 | 19.4 | |
| | | 19—20 | $3.3 \times 10^3$ | 0 | 100 | 0 | |
| | | 20—21 | — | — | — | — | − |
| 6 | 0.36 | −1—0 | $3.0 \times 10^5$ | 20.0 | 10.0 | 70.0 | |
| | ↓ 0.19 | 1—2 | $5.5 \times 10^4$ | 4.9 | 33.3 | 61.8 | |
| | ↓ 0.13 | 6—7 | $3.8 \times 10^3$ | 0 | 100 | 0 | |
| | | 13—14 | — | — | — | — | − |
| 7 | 0.36 | −1—0 | $6.8 \times 10^4$ | 5.9 | 28.0 | 66.1 | |
| | ↓ 0.19 | 2—3 | $1.8 \times 10^3$ | 0.6 | 85.0 | 14.4 | |
| | ↓ 0.13 | 6—7 | $8.2 \times 10^2$ | 0 | 100 | 0 | |
| | | 14—15 | — | — | — | — | − |

* Zero point of the scale was starting point of growth.

** Conidia were made to form on casein plates. The data represent the average of triplicate plates.

The relationship to the growth rates of $f$, $F$ and $F+f$ are then,

$$F \geqq F+f > f,$$

while these hyphae are growing in the middle part of the growth tube. Since the selection for $F$ is vigorous near the mouth of tube as revealed in Table 2,

Table 3. *Conidial frequencies and rates of growth of the heterocaryon between y lys F and w leu f in chimney tubes with casein medium*

| Tube No. | Rate of growth | Region from which conidia were harvested (cm of growth) | Number of viable conidia per ml | Percent of conidial types | | | Mixed colored conidia up to (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | hetero-caryon | *y lys F* | *w leu f* | |
| 1 | 0.31 | —1—0 | $3.0 \times 10^5$ | 14.4 | 4.6 | 81.0 | 12.0 |
| | ↓ | 9.5—10.5 | $4.3 \times 10^4$ | 5.6 | 2.1 | 92.3 | |
| | 0.45 | 23.5—24.5 | $3.3 \times 10^4$ | 0 | 100 | 0 | |
| 2 | 0.31 | —1—0 | $4.9 \times 10^5$ | 18.4 | 1.4 | 80.2 | 7.0 |
| | ↓ | 0—1 | $8.7 \times 10^4$ | 11.6 | 13.7 | 74.7 | |
| | ↓ | 3.5—4.5 | $2.6 \times 10^4$ | 24.7 | 8.7 | 66.6 | |
| | 0.45 | 18.5—19.5 | $2.9 \times 10^3$ | 0 | 100 | 0 | |
| 3 | 0.40 | —1—0 | $2.7 \times 10^5$ | 16.4 | 5.1 | 78.5 | 2.5 |
| | ↓ | 3.5—4.5 | $3.2 \times 10^2$ | 0 | 100 | 0 | |
| | 0.46 | 23.5—24.5 | $4.0 \times 10^3$ | 0 | 100 | 0 | |
| 4 | 0.40 | —1—0 | $3.7 \times 10^5$ | 17.7 | 0 | 82.3 | 2.5 |
| | ↓ | 0—1 | $2.5 \times 10^4$ | 16.5 | 10.5 | 73.0 | |
| | ↓ | 4—5 | $5.5 \times 10^3$ | 0.005 | 99.98 | 0.015 | |
| | 0.46 | 19—20 | $2.2 \times 10^3$ | 0.46 | 99.54 | 0 | |
| | | 20—21 | | — | + | — | |

it would be more effective to select for $F$ type if conditions in the whole tube were adjusted to be like those near the mouth.

**2. On C medium in chimney tubes.** Almost all heterocaryons in these tube had been completely taken over by the population of *y lys F* nuclei in the final stages of growth, as is summarized in Table 3. These growth curves were shown in Fig. 4. The hyphal tips formed a straight across the tube like those of the frontier in growth tube. In tubes No. 1 and 2, the heterocaryon grew at the rather slow rate of 0.31 mm per hour and formed a mixture of yellow and white conidia; it later increased its rate and changed its appearance to yellow forming a sector which originated in any point of the heterocaryotic hyphae. This observation well fitted the data of conidial frequencies

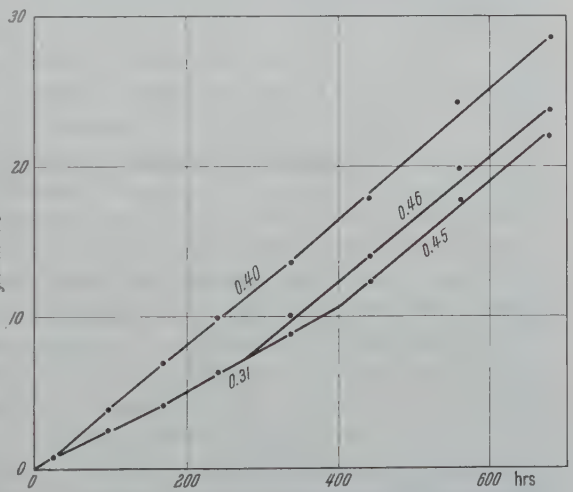



Fig. 4. Growth of heterocaryon between *y lys F* and *w leu f* on casein medium in chimney tube. Numbers show rate of growth in mm per hour

showing that no *leu* nuclei were found in the yellow colored regions, though there were a few heterocaryotic conidia in advanced regions of the No. 4 tube.

The relationship of growth rates of *f*, *F* and *F* + *f* is as follows,

$$F > F + f > f$$

(*y lys F*, 0.41 to 0.46 mm per hour; *F* + *f*, 0.31 mm per hour; *w leu f*[1], 0.14 to 0.20 mm per hour).

The *F* mutant possesses the strongest selective advantage and shows the fastest growth under aerated conditions.

**3. On CA medium in growth tubes.** Strains *f* and *F* both have the same rate of growth on CA medium, as shown in Table 1. Thus the selective advantage of one type is not expected to be expressed on this medium. Yet the *y lys F* or *w leu f* components of heterocaryons were completely selected for at points only 1 to 2 cm from the point of inoculating. Since the hyphal frontier on CA medium formed a curve, the hyphae at the middle of the frontier had a tendency to be selected for and to take over the original population by chance (RYAN, BEADLE and TATUM 1943).

## Discussion

A genetically homogeneous strain of *Asp. oryzae* will form a heterocaryon if spontaneous mutation takes place in the conidia or hyphae, because both conidia and hyphae are multi-nucleate. The population of nuclei in the resultant culture would thus differ from the original one. If we subject the heterocaryon to conditions unfavorable to one component type and favorable to the other, the nuclear population of the culture would shift toward the adapted type. PITTENGER and ATWOOD (1956) reported that selection for the faster growing component in a heterocaryon of *Neurospora crassa* did not occur on minimal agar medium in growth tubes because frequent anastomoses between hyphae interrupt the establishment of adapted hyphae on the medium. In *Asp. oryzae*, however, it is easy to find population changes in growth and chimney tubes since hyphal fusions seldom take place, and heterocaryons are produced frequently between germinated conidia (ISHITANI and SAKAGUCHI 1956).

We have often met the phenomenon that the fitter type for casein medium which must grow faster than the less fit, reduces its speed to that of the less fit, or even lower. The hyphae of the fitter type were unable to surmount this unfavourable condition once established; that is, they never regained their original growth rate. In the most extreme case growth slowed down gradually and finally stopped. But the original speed of growth was recovered whenever hyphal tips were transplanted to new medium. This phenomenon might be due to the fact that *Asp. oryzae* tends to secrete an organic acid into the medium which may inhibit its own growth under conditions of oxygen shortage. We are unable to recognize in ordinary growth tubes a type which is fitter for a certain medium from direct observation of the growth curve. Since no such difficulty was observed in the aerated chimney tube, the selection of fitter types would be expected to be more effective here.

The next paper will consider whether the faster grower on C medium usually has the ability to secrete more protease into the medium than the slow grower.

[1] This was confirmed by growing *w leuf* singly in triplicate chimney tubes.

## Summary

To examine the consequences of spontaneous mutation in multinucleate *Aspergillus oryzae*, the shift of nuclear ratio in heterocaryons produced artificially between a fast grower and a slow grower on casein-containing medium was studied throughout the course of growth. It was found that the cultivation of the heterocaryon on casein-containing medium always favored the selection of the faster grower. The faster grower had a better selective advantage when cultivated in a special tube, designed to give larger amounts of oxygen to the growing cells.


**Acknowledgment.** The author wishes to express sincere thanks to Prof. Y. Ikeda of this laboratory and Prof. Francis J. Ryan of the Department of Zoology, Columbia University, for many helpful discussions about this problem.

## Literature

Atwood, K. C., and F. Mukai: Nuclear distribution in conidia of *Neurospora* heterocaryons. Genetics **40**, 438—443 (1955). — Ishitani, C., and K. Sakaguchi: Hereditary variation and recombination in Koji-molds (*Aspergillus oryzae* and *Asp. sojae*). V. Heterocaryosis. J. Gen. and Appl. Microbiol. **2**, 345—400 (1956). — Pittenger, T. H., and K. C. Atwood: Stability of nuclear proportions during growth of *Neurospora* heterocaryons. Genetics **41**, 227—241 (1956). — Prout, T., C. Huebschman, H. Levene and F. J. Ryan: The proportions in nuclear types in *Neurospora* heterocaryons as determined by plating conidia. Genetics **38**, 518—529 (1953). — Ryan, F. J., G. W. Beadle and E. L. Tatum: The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. Amer. J. Bot. **30**, 784—799 (1943). — Sermonti, G.: Genetics of *Penicillium crysogenum*. 1. Heterokaryosis in *Penicillium crysogenum*. R. C. Ist. sup. Sanità **17** (English Edit.), 213—230 (1954). — Yoshida, T., and K. Narita: Table of amino acids contained in proteins. [In Japanese.] Chemistry of Protein **2**, 141 (1954).

Dr. Kazuyoshi Kiritani, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo (Japan)

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 190—197 (1959)

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan

# HETEROSIS OBSERVED IN *ASPERGILLUS ORYZAE* AND ITS SIGNIFICANCE IN KOJI MANUFACTURE

By

Kazuyoshi Kiritani and Yonosuke Ikeda

With 4 Figures in the Text

*(Received January 12, 1959)*

As reported in a previous paper, a mutant of *Aspergillus oryzae*, which was successfully isolated from the growth frontier in a race tube by employing casein medium as a selective agent, grew remarkably faster on this medium than did the parent culture (Kiritani 1959). Since the excretion of protease by hyphae results in the decomposition of casein into substances essential for growth of the fungus, it was supposed that the faster grower might yield more protease. The protease activities of the mutant, parent, sister strains and their heterocaryons were tested.

## Materials and Methods

### *Strains*

The following four mutant strains, one heterocaryon and two heterozygous diploids of *Asp. oryzae* between the mutants were assayed for protease activity. Strains *y lys F*, *y lys f* and *y lys* $f_h$ are lysine-dependent and have yellow conidial heads. The rate of growth of *f* or $f_h$ on casein agar in growth tubes is 0.23 mm per hour, while *F* grows at a rate of 0.36 mm per hour. The rates of growth of the *F* type on other media did not differ from those of the *f* types. The $f_h$ type has a morphology similar to the *F*, with scanty conidiation and relatively tall hyphae.

The *w leu f* is a leucine-dependent strain and has white conidial heads. The heterocaryon (*y lys f* + *w leu f*) which was obtained by Sermonti's limiting-supplement method, has normal morphology and is prototrophic. The heterozygous diploid $P_7\left(\frac{y\ lys\ f}{w\ leu\ f}\right)$ was produced by Ikeda et al. (1957), and Fd $\left(\frac{y\ lys\ F}{w\ leu\ f}\right)$ was selected during cultivation for protease production from a heterocaryon of the same components. These diploid strains bear green conidia and when cultivated for a long time segregate at a low frequency (ca. $10^{-8}$).

### *Medium*

These stocks of mutants were maintained on Fries No. 3 minimal medium and transferred to casein zinc medium (Cz medium) for the assay of protease activity. The Cz medium, a modified Fries No. 3, has the following composition:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glucose | 15.0 g | NaCl | 0.1 |
| $NH_4$-tartrate | 5.0 | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.1 |
| $NH_4NO_3$ | 1.0 | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 28.8 mg |
| $KH_2PO_4$ | 10.9 | Casein, purified | 4.0 g |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | 42.8 | $H_2O$, distilled | 1000 ml |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | | |

$KH_2PO_4$ was replaced by $KH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ corresponding to the concentration of M/5 phosphate buffer at $p_H$ 7.0 which suppresses fluctuation of the $p_H$ in the culture (Motonaga and Miura 1958). This concentration of phosphate, however, cannot

prevent a drop in the pH of the culture during the early stages of growth. The pH comes back to the level of 7 after maximum growth. When the normal concentration of $KH_2PO_4$ of Fries No. 3 (pH 5.5) was used, no detectable protease was excreted into the culture medium.

Trace elements were replaced by $10^{-4}$ molar $ZnSO_4$, as recommended by Yasui (1956). Casein was also added to this medium to induce the secretion of protease; casein dissolves easily in this medium. The Cz medium was supplemented with 200 mg L-lysine or L-leucine per liter for the growth of *lys* or *leu*; otherwise the mutants grow very little. This medium allows us to measure neutral and alkaline protease together, but not acidic protease. Tubes 22.5 to 23.5 mm in diameter and 200 mm in length were allotted 15 ml of Cz medium and autoclaved.

### *Measurement of protease activity*

A hyphal mat about 5 mm square was cut out from a slant 3 to 7 days old, inoculated into 15 ml of liquid Cz medium, and shaken at 30° C for 2 to 12 days on a reciprocal shaker. The tubes were removed from the shaker for an assay of protease activity at intervals of every 2 days. Since hyphae tend to attach to the glass walls of the tubes during their growth, they were scraped off into the medium every day. The resultant culture is made up of only hyphae and no conidia. The culture was then filtered through No. 2 Toyo filter paper.

The protease activity in 1 ml of the filtrate was assayed by a modified Anson method (Hagiwara 1953) using Difco purified casein as substrate. The optical density of the blue color of the Folin reagent, which appeared in proportion to the amounts of tyrosine and tryptophan liberated from the casein by the action of protease, was measured by a Kotaki photoelectric colorimeter.

### *Weight of dried hyphae*

The filtered hyphae were washed well with about 100 ml of distilled water, dried at 75° C. The hyphae became a constant weight after 24 hours of drying.

### *Degree of heterocaryosis*

The degree of heterocaryosis was determined by the following procedure. The hyphae from 6-day cultures were gathered, washed with about 50 ml of sterile water, suspended in 10 ml saline, and then macerated for 20 seconds in a Waring blendor. The suspension 0.2 ml was plated on both lysine- and leucine-supplemented agar and cultivated for 7 days. The conidia were harvested to determine their frequencies on different agar media.

## Experimental Results

### *Mode of protease production in the F, f and $f_h$ cultures*

*Protease activity.* The course of development of protease activity in each strain is represented in Fig. 1. The activity reached a maximum in 6-day cultures of *w leu f*, and in 8 day-cultures of strains *f*, $f_h$ and *F* of *y lys*. The production of protease from the hyphae of wild type started at a relatively early stage of growth and showed constant activity after 4 days.

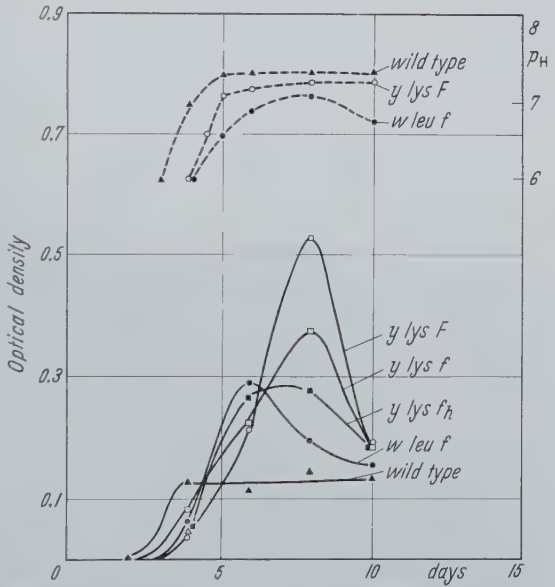



Fig. 1. Production of protease by haploid strains in submerged culture. The data represent the average of at least triplicate values. Straight lines show protease activity; and dotted lines show pH value

Table 1. *Protease activity in cultures of haploid strains of Aspergillus oryzae at peak time. Protease activity is measured in optical density units*

| Strain | Supplement added | Protease activity (O. D.) | Dry weight of hyphae (mg) | Protease activity per dry weight (O. D./mg × 100) | N percent in dried hyphae | $p_H$ of culture | Age of culture (days) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *y lys F* | Lysine . . | 0.355 | 53.5 | 0.664 | 5.28 | 7.4 | 8 |
| | | 0.581 | 52.7 | 1.102 | 4.88 | 7.4 | |
| | | 0.618 | 55.4 | 1.116 | 4.68 | 7.2 | |
| | | 0.568 | 54.8 | 1.037 | — | 7.2 | |
| | | 0.520 | 54.2 | 0.959 | — | 7.2 | |
| | Average | 0.528 | 54.1 | 0.976 | — | — | |
| *y lsy f* | Lysine . . | 0.331 | 63.4 | 0.522 | 5.08 | 7.4 | 8 |
| | | 0.435 | 65.7 | 0.662 | 5.03 | 7.4 | |
| | | 0.438 | 63.7 | 0.688 | 4.88 | 7.2 | |
| | | 0.355 | 69.0 | 0.515 | — | 7.2 | |
| | | 0.308 | 64.0 | 0.481 | — | 7.4 | |
| | Average | 0.373 | 65.2 | 0.574 | — | — | |
| *y lys* $f_h$ | Lysine . . | 0.481 | 64.0 | 0.752 | 5.19 | 7.4 | 8 |
| | | 0.315 | 66.9 | 0.471 | 4.85 | 7.4 | |
| | | 0.138 | 63.4 | 0.218 | 4.89 | 7.2 | |
| | | 0.252 | 64.2 | 0.393 | — | 7.4 | |
| | | 0.201 | 64.8 | 0.310 | — | 7.4 | |
| | Average | 0.277 | 64.7 | 0.429 | — | — | |
| *w leu f* | Leucine . . | 0.541 | 71.3 | 0.759 | — | 6.8 | 6 |
| | | 0.338 | 70.1 | 0.482 | — | 6.8 | |
| | | 0.175 | 73.7 | 0.237 | — | 7.0 | |
| | | 0.142 | 72.6 | 0.196 | — | 7.0 | |
| | | 0.262 | 61.0 | 0.430 | — | 7.0 | |
| | Average | 0.292 | 69.7 | 0.421 | — | — | |
| Wild type | None . . . | 0.150 | 62.0 | 0.242 | — | 7.4 | 8 |
| | | 0.128 | 65.2 | 0.196 | — | 7.4 | |
| | | 0.161 | 62.5 | 0.258 | — | 7.2 | |
| | Average | 0.146 | 63.2 | 0.232 | — | — | |

The protease activity of these strains at their peak times is summarized in Table 1. The fitter type *F* possesses the highest average protease activity. The values for *y lys F* were significantly higher than those for *y lys f* ($t = 10.5$,d. F.$= 8$, $p < 0.01$). The values of *y lys* $f_h$ are little different from those of *y lys f* in spite of the fact that the morphology of $f_h$ is similar to *F*. Obviously morphological similarity does not indicate similar protease activity.

*$p_H$*. The $p_H$ of each strain went down to about 6.0 during growth, but regained and continued the original value of 7.0 after 6 days. As a rule, the excretion of protease started when the $p_H$ was at its lowest, and it increased with the rise in $p_H$ as shown in Fig. 1.

*Dry weight*. Each strain reached full growth after 4 days in a shaken culture and the hyphae lost weight gradually as it broke up into small fragments. The culture turned very viscous and hard to pass through No. 2 filter paper after 12 days. The degree of decrease in the dry weight of hyphae during shaking differs from strain to strain, but the average rate of loss is about 10 mg per day (Fig. 2).

The *y lys F* strain has relatively small amounts of hyphae at maximum growth; it loses weight slowly and constantly throughout the cultivation. On

the other hand, the *y lys f* strain decreased in weight quickly after reaching its maximum.

The remarkable character of the fitter type (the stronger producer of protease) is well kept in the diploid when paired with *w leu f*.

### *Heterosis in the production of protease*

*Protease activity.* Ikeda et al. (1957) reported that the heterozygous diploid strain ($P_7$) has significantly higher protease activity in the hyphae than each of its component strains, when grown on wheat bran medium. The diploid $P_7$ also excreted the large amounts of protease into minimal Cz medium, as shown in Fig. 3.

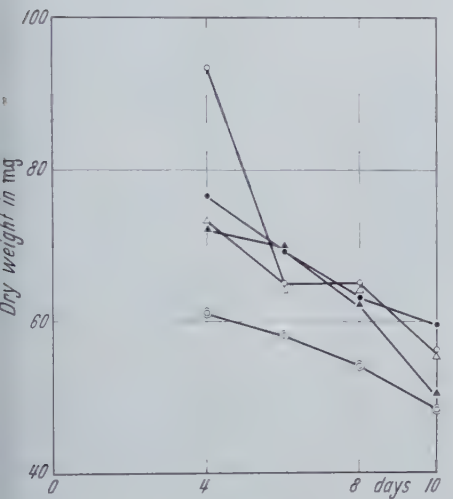



Fig. 2

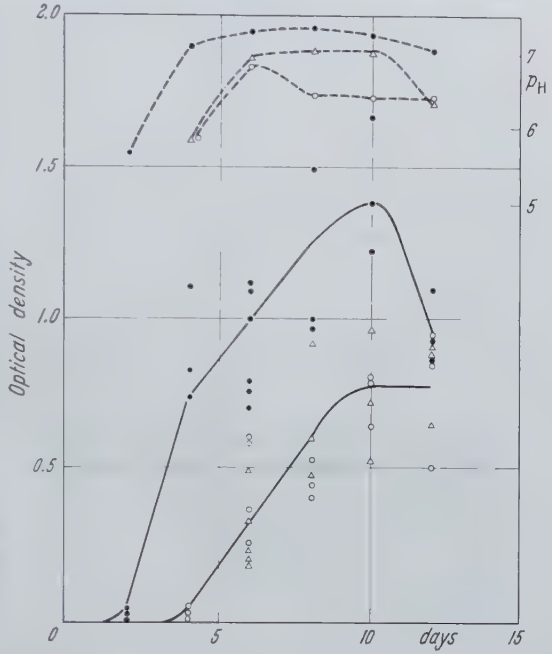



Fig. 3

Fig. 2. Dry weight of the haploid strains growing in Cz medium. The open circles (○) represent the *y lys f*; the triangles (△) represent the *y lys* $f_h$; the closed circles (●) represent the wild type; the closed triangles (▲) represent *w leu f*; and the dotted circles (◎) represent *y lys F*

Fig. 3. Production of protease in submerged culture by the heterocaryon and the heterozygous diploids. The open circles (○) represent the heterozygous diploid strain $P_7$ (*y lys f* and *w leu f*), the triangles (△) represent a heterocaryon between the same components; and the closed circles (●) represent the heterozygous diploid Fd (*y lys F* and *w leu f*). Straight lines show protease activity; and dotted lines show pH value

The protease excretion of $P_7$ and of the heterocaryon between the same components begins after 4 days, when the hyphae in the culture have reached full growth, and maintains the constant activity after 10 days. The heterocaryon between *y lys F* and *w leu f*, which was later recognized the heterozygous diploid Fd, begins to excrete after 2 days though the full growth was not reached for 4 days, keeps increasing for 8 days and then the activity decreases. The protease activity exceeded throughout those of the heterocaryon and the heterozygous diploid between less fit types.

There is a possibility that a mixture of two complementary types might excrete as much protease as the heterocaryon or diploid, if they made the essential nutrients for each other. In order to test this possibility, *y lys F* and *w leu f*

or *y lys f* and *w leu f* were inoculated together into $L^+L^+$ Cz medium and were assayed for protease activity according to the routine method. The hyphae obtained were only a mixture of two strains, however; that is, the strains had not become heterocaryons and did not grow on minimal Cz medium. The activity found in these cultures was that of *w leu f* or even lower. Table 2 shows the protease activity and the dry weights at peak time.

Table 2. *Protease activity in cultures of diploids, a heterocaryon and mixtures of two strains at peak time. Protease activity is measured in optical density units*

| Strain | Supplement added | Protease activity (O. D.) | Dry weight of hyphae (mg) | Protease activity per dry weight (O. D./mg × 100) | N percent in dried hyphae | $p_H$ of culture | Age of culture |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fd | None . . . | 1.223 | 49.5 | 2.471 | 5.35 | 7.2 | 10 |
| | | 1.387 | 59.9 | 2.316 | 4.37 | 7.3 | |
| | | 1.663 | 60.3 | 2.758 | — | 7.4 | |
| | Average | 1.424 | 56.6 | 2.515 | — | — | |
| *y lys f* and *w leu f* | None . . . | 0.523 | 55.2 | 0.947 | 6.30 | 7.0 | 10 |
| | | 0.735 | 50.4 | 1.458 | 6.38 | 7.0 | |
| | | 0.961 | 45.0 | 2.136 | — | 7.0 | |
| | Average | 0.740 | 50.2 | 1.514 | — | — | |
| $P_7$ | None . . . | 0.797 | 38.6 | 2.065 | — | 6.4 | 10 |
| | | 0.646 | 39.6 | 1.631 | — | 6.4 | |
| | | 0.804 | 34.8 | 2.310 | — | 6.4 | |
| | Average | 0.749 | 37.7 | 2.002 | — | — | |
| Mixture of *y lys F* and *w leu f* | Lysine and leucine | 0.533 | 58.7 | 0.908 | — | 6.8 | 8 |
| | | 0.296 | 43.8 | 0.676 | — | 7.4 | |
| | | 0.276 | — | — | — | 7.4 | |
| | | 0.300 | — | — | — | 7.4 | |
| | Average | 0.351 | — | — | — | — | |
| Mixture of *y lys f* and *w leu f* | Lysine and leucine | 0.126 | 62.9 | 0.200 | — | 7.4 | 8 |
| | | 0.125 | 66.9 | 0.187 | — | 7.4 | |
| | | 0.150 | — | — | — | 7.4 | |
| | | 0.162 | — | — | — | 7.4 | |
| | Average | 0.141 | — | — | — | — | |

*$p_H$.* The $p_H$ in the cultures was about 6.0 at the time of onset of protease excretion; it shifted to neutral as time elapsed, as found with all haploid strains. After 12 days the $p_H$ lowered to 6.3 for *y lys F + w leu f*. A somewhat peculiar $p_H$ curve was obtained for $P_7$. The time of onset of a rise in $p_H$ was the same as that of the heterocaryon between less fit types, but in $P_7$ value immediately fell to 6.4 after reaching a maximum of 6.8 at 6 days, and it stayed at 6.4 until the end of the experiment.

*Dry weight.* The degradation curves of hyphae, plotted as mg of dry weight against time, are shown in Fig. 4. The autolysis of hyphae of these strains was very rapid compared with that of haploid strains. Fd has a lower maximum dry weight and loses weight slowly as the *F* type does, though its curve is quite different from that of *F*.

### *Heterocaryosis in the hyphae*

Since it was not known whether the hyphae grown from an inoculum of a heterocaryon were completely heterocaryotic or whether they represented a

mixture derived from the heterocaryon by nuclear segregation followed by vegetative dissociation and growth, further experiments were carried out to determine nuclear frequencies in the hyphae using the differential plating method (Prout, Huebschman, Levene and Ryan 1953; Atwood and Mukai 1955).

Hyphae derived from *y lys f + w leu f* were found to contain nuclei of both components in the Cz culture. On the other hand, hyphae derived from *y lys F + w leu f* had been changed to a diploid state. This was proved by the following three facts: (1) when the conidia were plated on differential media, the same number of colonies appeared on each plate; (2) giant colonies on complete agar showed homogeneous growth with green conidia and with small sectors at the margin of the colony; the phenotype of the sectors was either *y lys F* or *w leu f*; (3) the heterocaryon on the original slant, prepared as an inoculum for the Cz culture, segregated out its components in the usual ratio. Therefore, the selective growth of the diploid Fd, which preexisted in the heterocaryon, occured during cultivation in Cz medium.

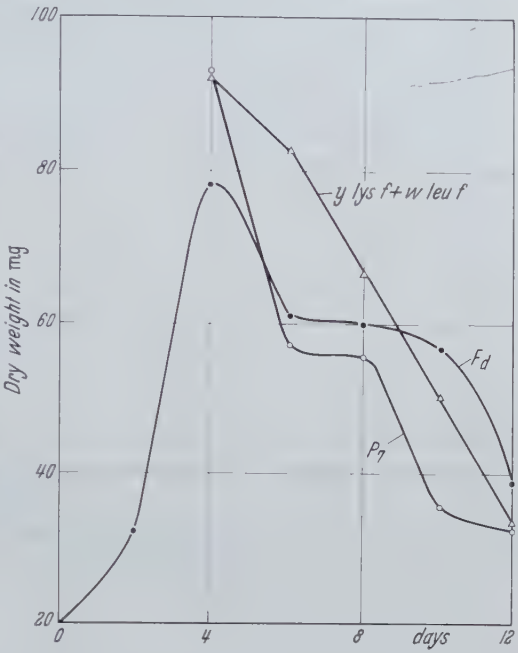



Fig. 4. Dry weight of the heterocaryon and the heterozygous diploid strains growing in Cz medium

## Discussion

We assumed previously that the faster grower might possess more protease, indispensable for the growth on casein, than the slow grower. To test this hypothesis, it was necessary to know how much protease is excreted into the medium during hyphal growth. We have failed in this determination because a strong acid is produced by the hyphae in the growing phase which brings about a drop in the $p_H$ and a breakdown of the enzyme. Even if the activity of the enzyme after full growth was the same as during growth, the activity of the fitter type *y lys F* is far less than that of the heterocaryon between less fit types which grow slowly on casein medium. Hence, a direct relationship between growth and production of protease seems to be excluded by the above experiments. Since less fit types grow faster on casamino acid medium than on casein medium, failure in the present investigations to confirm the faster grower as a good yielder of protease is believed not to preclude this relationship.

The protease activity of the heterocaryon or the heterozygous diploid was about the sum of the activities of their component strains for the first 8 days.

The production by fermentation of citric acid and gluconic acid in heterocaryons of *Asp. fonsecaeus* were examined by CIEGLER and RAPER (1957), and the production of kojic acid in heterocaryons of *Asp. oryzae* by IKEDA (1958). None of these investigators could, however, show an effect of heterocaryotic vigor on the products of fermentation in the heterocaryon when relatively high acid yielders were paired. The resulting heterocaryon gave yields that were lower than those produced by either of the two parent strains. If high and low acid producing strains were paired, the resulting heterocaryon produced intermediate yields. There might be some unfavorable interaction between the enzymes created by the nuclei of two components in the same cytoplasm. A simple explanation of the heterosis observed in our case in both the heterocaryon and the heterozygous diploid of *Asp. oryzae* is to postulate that both component genomes may make protease independently in the same cytoplasm where the density of nuclei of each type is 50 per cent, and consequently the amounts of enzyme are the sum of the two components. But this explanation is still unable to elucidate the phenomenon that enzyme activity in the heterocaryon or the diploid keeps at a high level beyond 8 days, when that of haploid strains has fallen off. It seems to be impossible to analyse the mechanism of this behavior from the present data. Since the heterocaryon has genetically unlike nuclei within a common cytoplasm and the heterozygous diploid possesses unlike genetic sets within the nucleus, comparison between these strains should make the nuclear and cytoplasmic interaction clear.

## Summary

As is expected, a fast growing mutant on casein medium produced larger amount of protease than its parent or sister cultures. As a rule, the mutant yielded protease in a later stage of growth in contrast to its sister strain which produced it at an earlier stage. The heterocaryon between slow growing strains produced protease early as well as late, and the activity increased far beyond the production limit of each component strain. Upon measuring the nuclear ratios during cultivation, the effect was considered to be due to heterocaryotic vigor or a kind of heterosis. The heterozygous diploid between slow growers also yielded protease as well as the heterocaryon. When fast grower and slow grower were paired, the resulting diploid showed the highest activity of the enzyme among these strains.

**Acknowledgment.** The present authors acknowledge the kind advice of Dr. FRANCIS J. RYAN of the Department of Zoology, Columbia University, and of Mr. T. YASUI of the Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo.

## Literature

ATWOOD, K. C., and F. MUKAI: Nuclear distribution in conidia of *Neurospora* heterocaryons. Genetics **40**, 438—443 (1955). — CIEGLER, A., and K. B. RAPER: Application of heterocaryons of *Aspergillus* to commercial type fermentations. Appl. Microbiol. **5**, 106—110 (1957). — HAGIWARA, B.: Protease, pp. 207—212. Hyojun Seikagaku Jikkenho: Bunkodo Co. Ltd. 1953. — IKEDA, Y.: Genetic background of Kojic acid production studied with metabolic mutants of *Aspergillus oryzae*. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **22**, 233—238 (1958). —

Ikeda, Y., K. Nakamura, K. Uchida and C. Ishitani: Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidation. J. Gen. and Appl. Microbiol. **3**, 93—101 (1957). — Kiritani, K.: Selection of fitter type nuclei in heterocaryons of *Aspergillus oryzae*. Z. f. Vererb.-Lehre **90**, 182—189 (1959). — Motonaga, K., and Y. Miura: Protease production by a submerged culture of *Aspergillus oryzae*. Part I. Selection of strain and medium suitable for producing protease active in neutral and alkaline reaction. [In Japanese.] J. Agr. Chem. Soc. Japan **32**, 422—426 (1958). — Prout, T., C. Huebschman, H. Levene and F. J. Ryan: The proportions in nuclear types in *Neurospora* heterocaryons as determined by plating conidia. Genetics **38**, 518—529 (1953). — Yasui, T.: The effect of Zn on the production of protease in *Aspergillus oryzae* (Speech at the monthly meeting of the Agricult. Chem. Soc. of Japan.) 1956.

Dr. Kazuyoshi Kiritani, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo (Japan)

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 198—214 (1959)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

# DIE BILDUNG VON KEIMZELLEN MIT EUPLOIDEN CHROMOSOMENZAHLEN AUS TRIPLOIDEN UND ANEUPLOIDEN POLLENMUTTERZELLEN ABREGULIERENDER POLYPLOIDER PFLANZEN

Von

Werner Gottschalk

Mit 12 Textabbildungen

*(Eingegangen am 26. Februar 1959)*

## A. Einleitung

Die züchterische und cytologische Bearbeitung einer großen Anzahl experimentell erzeugter tetraploider Stämme diploider Versuchspflanzen hat in den vergangenen 2 Jahrzehnten immer wieder gezeigt, daß die Polyploiden in wechselnder Häufigkeit zur Rückregulierung neigen, daß also einige Generationen nach der erfolgreich verlaufenen Erhöhung der Genomstufe wieder Organismen mit der ursprünglichen diploiden Chromosomenzahl auftreten. Durch eine eingehende cytologische Bearbeitung derartiger Versuchspflanzen war es zwar möglich, einen Einblick in gewisse, vom Normalverhalten abweichende cytologische Mechanismen zu erhalten, die mit der Abregulierung in Zusammenhang stehen dürften (Gottschalk 1958a, b), das Phänomen in seiner Gesamtheit erwies sich in cytologischer Beziehung jedoch als so komplex, daß es noch keineswegs als geklärt betrachtet werden kann. Es ist vielmehr notwendig, die empirischen Unterlagen zu erweitern und an künstlich polyploidisierten Pflanzen nach weiteren cytologischen Vorgängen zu suchen, die mit der Herabregulierung der Chromosomenzahl zum Ausgangszustand in Verbindung gebracht werden können.

Die Hauptschwierigkeit der Bearbeitung dieser Fragestellung liegt in der hohen cytologischen Stabilität der Polyploiden: Der Anteil an abregulierenden Pflanzen ist im allgemeinen so gering, daß dem Experimentator kein umfangreiches Versuchsmaterial zur Verfügung steht, er ist vielmehr auf Zufallsbeobachtungen angewiesen. Über die Häufigkeit der Rückregulierung liegen für *Hordeum* einige Angaben vor. Nach Müntzing (1957) treten in der Nachkommenschaft tetraploider Gersten in einer Häufigkeit von 5000—6000:1 diploide Pflanzen auf. Wesentlich höhere Werte gibt Ohlendorf (nach Hertzsch 1951) für das gleiche Objekt an: sie fand in der 5. Generation nach der Polyploidisierung bei Berücksichtigung von 144 Pflanzen einen Anteil von 16,2% an Diploiden. Bei anderen Objekten [etwa *Spinacia oleracea*, *Lepidium sativum* (Schwanitz 1941) oder *Vicia villosa* (Hertzsch 1951)] liegt der Anteil abregulierender Pflanzen wesentlich höher, die genannten Arten sind jedoch aus cytologischen Gründen für eine eingehende Bearbeitung dieser Vorgänge wenig geeignet. Es muß daher durch Einbeziehung möglichst vieler cytologisch günstiger Objekte der Versuch gemacht werden, weitere Species mit hoher Neigung zur Abregulierung aufzufinden.

Den bisher erarbeiteten Befunden ist trotz ihrer Vielgestaltigkeit die Tatsache gemeinsam, daß aus einem polyploiden Kern im Verlauf abweichender

meiotischer oder prämeiotischer Vorgänge einzelne Genome ausgesondert werden. Wenn es auch noch nicht gelungen ist, den exakten cytologischen Beweis dafür zu erbringen, daß die ausgesonderten Chromosomengruppen vollständige Genome darstellen, so kann doch aus beweiskräftigen Befunden geschlossen werden, daß diese entscheidende Voraussetzung der Abregulierung erfüllt ist. Die bisher beobachteten Genomsonderungen sind zum überwiegenden Teil in Zellen mit euploiden Chromosomenzahlen gefunden worden, also in tetra- und oktoploiden Zellen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind an triploiden und aneuploiden Zellen vorgenommen worden, in denen das Vorliegen gesetzmäßiger Abweichungen vom meiotischen oder mitotischen Normalverhalten teilweise noch deutlicher in Erscheinung tritt.

## B. Material und Methode

Im Verlauf 3jähriger Versuche wurden in einem Material von mehr als 200 experimentell erzeugten tetra- und oktoploiden Tomaten der Handelssorte „Immun" insgesamt 13 zur Abregulierung neigende Versuchspflanzen gefunden und cytologisch ausgewertet. Zur Bearbeitung der Meiosis wurden die jungen Blütenknospen in Carnoy fixiert, mit Carmin-Essigsäure unter Eisenzusatz gefärbt und als Quetschpräparate verarbeitet. Die Herstellung der polyploiden Pflanzen erfolgte durch Keimung diplo- und tetraploider Samen auf Colchicin-Agar nach Swaminathan (1950). Methodische Einzelheiten können einer früheren Publikation (Gottschalk 1958a) entnommen werden.

## C. Empirischer Teil

Die in der Folge behandelten tetra- und oktoploiden Versuchspflanzen zeigen vielfältige meiotische und prämeiotische Störungen, die auf eine hohe cytologische Labilität dieser Organismen schließen lassen. Die erhaltenen Befunde wurden, soweit sie mit dem Abregulierungsproblem in Verbindung stehen, zum Teil bereits publiziert (Gottschalk 1958a, b, 1959). In der vorliegenden Arbeit werden nur triploide und aneuploide PMZ der tetra- und oktoploiden Antheren berücksichtigt.

### *1. Die Aussonderung von Genomen in Verbindung mit atypischen Reduktionsteilungen bei der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 1412*

Die Versuchspflanze Nr. 1412 entstand nach Keimung diploider Samen auf Colchicin-Agar. Sie war am Anfang der Anthese weitgehend steril und brachte erst gegen Ende der Ontogenese einige Früchte. Die Chromosomenzahlen entsprachen zwar in der überwiegenden Mehrzahl aller PMZ der tetraploiden Valenz, es ließen sich jedoch in vielen Antheren abweichende meiotische Verhältnisse nachweisen. Es traten zunächst alle meiotischen Abregulierungsvorgänge in Erscheinung, die für andere tetraploide Versuchspflanzen bereits beschrieben wurden (Gottschalk 1958a). Das gilt für die Verteilungen von $n + 3n$, $n + n + 2n$ und $n + n + n + n$ in der 1. Telo- oder 2. Metaphase sowie für die entsprechenden Verteilungen in den späten Stadien der 2. meiotischen Teilung. Auch prämeiotische Abregulierungsvorgänge wurden des öfteren beobachtet, die zumindest in einem Teil der betroffenen Zellen offenbar zu einem genomatischen Gleichgewicht geführt haben, denn es traten vereinzelt PMZ mit 12 Bivalenten in MI und mit 12chromosomigen Tetradenkernen auf. Daneben fanden sich degenerative Erscheinungen sowie Spindelanomalien, auf die in anderem Zusammenhang näher eingegangen wird. Die Pflanze entspricht damit im Hinblick auf das Auftreten regulativer Prozesse der früher bearbeiteten Versuchspflanze Nr. 934, sie enthält jedoch zusätzlich noch einige bisher nicht bekannte meiotische Regulierungsmechanismen, die im folgenden näher besprochen werden sollen.

In einigen Antheren der Pflanze waren neben aneuploiden PMZ auffallend viele *triploide* Gonotokonten vorhanden, in denen die Reduktionsteilung in einer

sehr bemerkenswerten Weise vom Normalverhalten abwich. In einer vorwiegend tetraploiden Anthere konnten insgesamt 66 triploide PMZ cytologisch ausgewertet werden. Die erwartete Bildung von 4 etwa gleichgroßen Gonen mit den für triploide Organismen charakteristischen aneuploiden Chromosomenzahlen, in unserem Falle etwa $4 \times 18$, trat in keiner dieser 66 Zellen in Erscheinung. Es wurden in der 2. meiotischen Teilung vielmehr ausschließlich nur 3 Gonen mit je 24 Chromosomen gebildet (Abb. 1). Leider konnten in den fraglichen PMZ nur die letzten meiotischen Stadien erfaßt werden, es können daher keine näheren Angaben über den Ablauf dieser abweichenden Form der Meiosis gemacht werden.

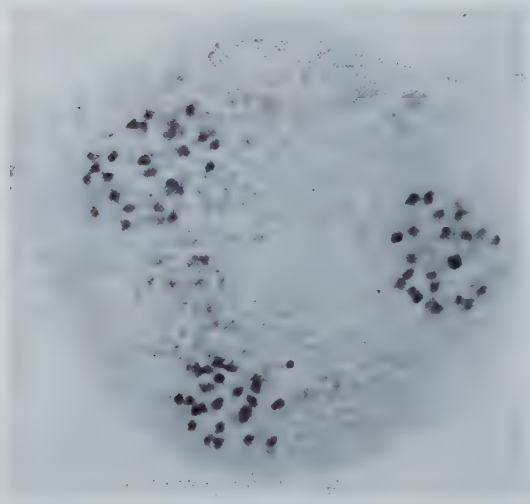


Abb. 1. Beginnende 2. Interphase einer triploiden PMZ der tetraploiden Pflanze Nr. 1412. Es werden drei 24chromosomige Gonen gebildet (1200fach)

Desgleichen war es nicht möglich, den exakten Beweis dafür zu erbringen, daß die 24chromosomigen Gonen nicht nur die diploide Chromosomenzahl, sondern 2 vollständige Genome enthalten; bei Berücksichtigung des gleichartig abweichenden Verhaltens aller analysierten PMZ sowie nach Einbeziehung weiterer analoger Befunde an anderen Zellen der gleichen Anthere (s. unten) kann an der Richtigkeit dieser Annahme jedoch kaum gezweifelt werden. *Es kann wohl als sicher angenommen werden, daß die Meiosis in den triploiden PMZ der fraglichen Anthere nicht nach dem Prinzip der zahlenmäßigen Reduktion der Chromosomen ablief, es standen vielmehr ganz eindeutig genomatische Gesichtspunkte im Vordergrund. Die entscheidende Folge dieses im einzelnen noch nicht geklärten meiotischen Stadienablaufs liegt darin, daß aus triploiden PMZ funktionsfähige diploide Keimzellen entstehen, daß also trotz eines karyologisch unbalancierten und damit zur Sterilität führenden Ausgangszustandes ein balancierter, fertiler Endzustand erreicht wird.*

Die Richtigkeit der Annahme einer vorwiegend genomatischen Chromosomenverteilung in Zellen mit unbalancierten Chromosomenzahlen geht besonders deutlich aus dem meiotischen Verhalten einer größeren Anzahl aneuploider PMZ der gleichen Anthere hervor, deren Chromosomenzahlen entweder nur wenig über der triploiden oder zwischen der triploiden und der tetraploiden Valenz lagen. Für diese Untersuchungen standen zunächst 26 Gonotokonten in den Stadien 2. Telophase und frühe 2. Interphase zur Verfügung; ihre Chromosomenzahlen variierten zwischen 77 und 84 (die rein tetraploide Chromosomenzahl wäre $4n = 96$). In keiner dieser Zellen wurden Gonen mit etwa gleicher Chromosomenzahl gebildet, als Ergebnis der Meiosis entstanden vielmehr in 22 Zellen jeweils drei 24chromosomige — also offenbar diploide — Gonen. Der noch vorhandene Rest von 5—12 Chromosomen lag in Form eines kleinen 4. Kernes vor (Abb. 2). In

einigen Zellen wurden an diesen in genomatischer Beziehung „überzähligen" Chromosomen degenerative Vorgänge beobachtet, während die anderen 3 Kerne der gleichen PMZ morphologisch völlig normal waren. *Es kommt also auch hier nicht die erwartete zahlenmäßige Reduktion, sondern eine Einregulierung der Chromosomenzahl nach dem Prinzip von 2n + 2n + 2n + Rest zustande.* Lediglich 4 der oben genannten 26 PMZ wichen von dieser Regel ab, jedoch nicht im Sinne einer normalen Meiosis. Sie zeigten in TII bzw. JII folgende Chromosomenverteilungen:

24 + 24 + 27 + 7
24 + 20 + 28 + 12
24 + 24 + 12 + 18
24 + 12 + 18 + 18

Auch in diesen Zellen ist die Tendenz zur Bildung 24chromosomiger Gonen unverkennbar, nur scheint der Prozeß, der zu dieser „Ideallösung" führt, hier nicht störungsfrei abgelaufen zu sein.

Abb. 2. Die Bildung von drei 24chromosomigen (= diploiden) Gonen in einer hypertriploiden PMZ der tetraploiden Pflanze Nr. 1412. Ein vierter kleiner Kern enthält 7 Chromosomen (1200fach)

Die gleiche Anthere lieferte noch andere Beispiele, die meines Erachtens nur im Sinne einer genomatischen Einregulierung gedeutet werden können. Zunächst war eine *hypertetraploide* PMZ mit einer Gesamtzahl von etwa 108 Chromosomen in den späten Stadien der 2. meiotischen Teilung vorhanden. Sie enthielt nicht 4, sondern 5 Kerne, deren Chromosomenzahlen den Valenzen 2n + 2n + 2n + 2n + n entsprachen. Einige andere hypertetraploide Zellen zeigten in MII die Verteilung von 24 + 24 + 3 Chromosomen. Ganz entsprechende Vorgänge waren bei *hypotetraploiden* PMZ zu beobachten. So wurden die 39 Chromosomen einer PMZ in der 1. meiotischen Teilung nach 24 + 15 verteilt. Eine 40chromosomige Zelle zeigte in MII 3 Äquatorialplatten mit 12 + 12 + 16 Chromosomen, und in zwei 26chromosomigen Zellen waren in TII je 4 Kerne mit 12 + 12 + 12 + 16 Chromosomen vorhanden. Schließlich sollen in diesem Zusammenhang noch 4 *hyperdiploide* Gonotokonten erwähnt werden, die in der 2. Teilung nur 3 Gonen ausbildeten. Die Verteilung ihrer Chromosomenzahl lag bei

24 + 24 + 12 (3 Zellen)
24 + 24 + 10 (1 Zelle).

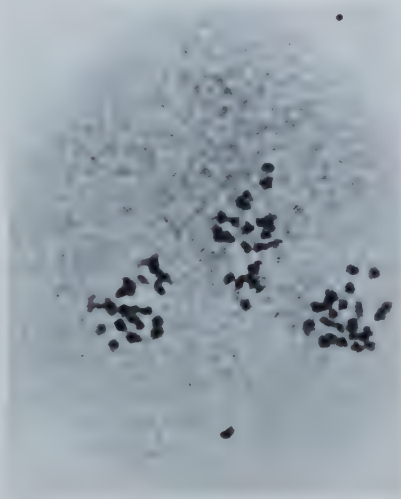


Abb. 3. Die Bildung von 3 diploiden Gonen in einer triploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934 (1200fach)

In allen diesen aneuploiden Gonotokonten treten 12- und 24chromosomige Triaden- und Tetradenkerne auf, die bei einem normalen meiotischen Stadienablauf unter Berücksichtigung der gegebenen chromosomalen Verhältnisse nicht oder bei weitem nicht in der beobachteten Häufigkeit zu erwarten sind. Ähnliche Vorgänge wurden in geringerer Anzahl auch in anderen Antheren dieser Versuchspflanze beobachtet, darunter die für die Versuchspflanze Nr. 934 bereits beschriebene Anaphasenverteilung von $n + 2n$.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die für die Pflanze Nr. 1412 besonders charakteristische Bildung von 3 diploiden Gonen aus einer triploiden PMZ mehrfach auch in einer Anthere der Versuchspflanze Nr. 934 gefunden wurde (Abb. 3). Das gleiche gilt für die Kombination von $2n + 2n + 2n +$ Rest und $2n + 2n +$ Rest in der 2. meiotischen Teilung.

### *2. Die Aussonderung von Genomen in aneuploiden Pollenmutterzellen anderer polyploider Versuchspflanzen*

Ähnliche Einregulierungsvorgänge, wie sie soeben für die Versuchspflanze Nr. 1412 beschrieben wurden, fanden sich in geringerer Häufigkeit in vielen der bearbeiteten polyploiden Pflanzen. In einer Anthere der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 2/57 wurden mehrfach aneuploide PMZ gefunden, in denen die Phänomene der Herabregulierung der Chromosomenzahl und der genomatischen Einregulierung offenbar kombiniert waren. Zur Charakterisierung dieser Verhältnisse seien aus einer größeren Zahl ähnlich gelagerter Fälle folgende Beispiele herausgegriffen: In einer 42chromosomigen (also *hypotetraploiden*) PMZ wurden nicht die erwarteten 4 Gonen mit etwa je 21 Chromosomen gebildet, es traten in der 2. Telophase vielmehr 6 Kerne mit $12 + 12 + 12 + 12 + 18 + 18$ Chromosomen auf. Prinzipiell die gleichen Verhältnisse liegen wohl bei einer 38chromosomigen PMZ vor, die 8 Gonen zur Ausbildung brachte, davon 4 mit der haploiden Chromosomenzahl, die anderen 4 mit $(6 + 6) + (8 + 8)$ Chromosomen. Ein ähnlicher Fall ist in Abb. 4 dargestellt. Eine andere Zelle mit $2n = 37$ Chromosomen bildete in der 2. Telophase 4 haploide Kerne, der Rest von 26 Chromosomen war regellos in der Zelle verteilt und wurde offensichtlich nicht zu Kernen vereinigt. Schließlich müssen noch einige *zweikernige PMZ* angeführt werden, die im Zusammenhang mit meiotischen und prämeiotischen Abregulierungsvorgängen bei hochpolyploiden Versuchspflanzen gelegentlich auftreten (GOTTSCHALK 1958b). Auch in derartigen Zellen wurden — soweit sie unbalancierte chromosomale Verhältnisse aufwiesen — Einregulierungsprozesse beobachtet. So trat in der okto-

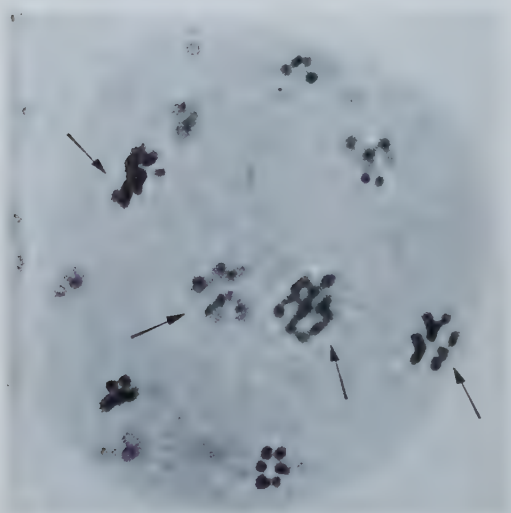


Abb. 4. Hypotetraploide PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 14. Die Gesamtzahl der Chromosomen in der 2. Telophase beträgt etwa 90 ($96 = 4n$). In der Zelle werden 11 Gonen gebildet, davon 4 mit der haploiden Chromosomenzahl (Pfeile; 2200fach)

ploiden Versuchspflanze Nr. 75 eine PMZ auf, die bereits in der 1. Telophase 4 Tochterkerne mit Chromosomenzahlen von 24 + 24 und etwa 18 + 18 besaß. Diese Anordnung ist auf eine zweikernige Pro- und Metaphase zurückzuführen; die beiden Kerne enthielten 48 + etwa 36 Chromosomen. Durch die normale Reduktion der Chromosomenzahl ist gegen Ende der 1. meiotischen Teilung der oben angegebene Zustand der PMZ entstanden. Die Valenz des Gonotokonten lag offenbar bei $7n$, die 7 Genome sind jedoch nicht in 2 Teilkomplexe mit gleichen Chromosomenzahlen, sondern nach der genomatischen Kombination von $4n + 3n$ aufgegliedert worden. Ganz entsprechende Verhältnisse wurden in einer hypertetraploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 2/57 beobachtet: die Zelle besaß bereits in der 1. Metaphase 2 Äquatorialplatten mit je 12 Bivalenten,

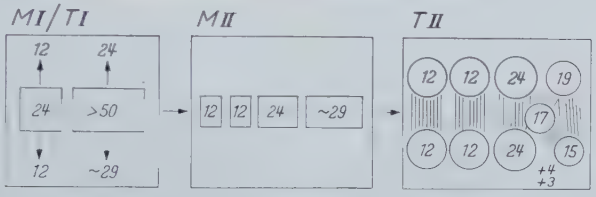



Abb. 5. Beispiel für die Entstehung haploider und diploider Gonen in einer zweikernigen aneuploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 16. In der aneuploiden Zelle besitzt bereits einer der beiden Prophasekerne die diploide Chromosomenzahl von 24. Aus dem 2., aneuploiden Kern wird durch eine unregelmäßige Chromosomenverteilung in der 1. Anaphase ein weiterer 24chromosomiger Tochterkern abgesondert. Durch das Auftreten von 3 bipolaren und einer tripolaren Spindel in der 2. Teilung entstehen insgesamt 9 Gonen

außerhalb der Platten waren noch 5 Einzelchromosomen vorhanden. Es entspricht dies ganz offensichtlich genomatisch der Anordnung von $2n + 2n +$ Rest.

Ähnliche, wenn auch noch kompliziertere Vorgänge sind in aneuploiden zweikernigen Gonotokonten mit Valenzen zwischen $4n$ und $8n$ vereinzelt aufgetreten. In Abb. 5 ist eine PMZ mit insgesamt 9 Kernen in der 2. Telophase dargestellt (tetraploide Versuchspflanze Nr. 16/58). 6 dieser 9 Kerne enthalten euploide Chromosomenzahlen ($4 \times 12$ und $2 \times 24$); der Rest von etwa 51 Chromosomen ist aus einer tripolaren Spindel verteilt worden, weitere 7 Chromosomen sind nicht mit in die entstehenden Kerne einbezogen worden. Diese Verhältnisse sind auf eine *zweikernige PMZ* zurückzuführen, die Chromosomenzahlen in den beiden Pro- und Metaphase-Kernen haben bei 24 und >50 gelegen. Aus der 24chromosomigen Äquatorialplatte sind zwei 12chromosomige Tochterkerne und schließlich 4 haploide Gonen entstanden. Im aneuploiden 2. Kern jedoch ist in der 1. Anaphase offenbar eine Genomsonderung nach dem Schema $2n + >2n$ zustande gekommen. Der diploide Tochterkern der 2. Spindel bringt nach Abschluß der 2. meiotischen Teilung 2 diploide Gonen hervor, während die restlichen Chromosomen nach Ausbildung einer tripolaren Spindel zufallsgemäß verteilt werden.

In der ebenfalls tetraploiden Versuchspflanze Nr. 15/58 war eine *heptaploide* zweikernige PMZ vorhanden, ihre beiden Prophase-Kerne enthielten 24 + 60 Chromosomen, das entspricht den Valenzen $2n + 5n$ (Abb. 6). Aus der 24chromosomigen Äquatorialplatte entstehen — wie im oberen Beispiel — letzten Endes 4 haploide Gonen. Die 60 Chromosomen des 2. Kerns werden bereits in der 1. Anaphase im Rahmen einer tripolaren Spindel auf 3 Telophasenkerne mit den Chromosomenzahlen 36 + 15 + 9 verteilt. Es sind also bereits gegen Ende der 1. meiotischen Teilung 5 Tochterkerne im Gonotokonten vorhanden, von denen 3 euploide Chromosomenzahlen besitzen. Die 2. meiotische Teilung verläuft normal und führt zur Genomkombination von (36 + 36) + (12 + 12) + (12 + 12) + (15 + 15) + (9 + 9).

Für andere Versuchspflanzen seien noch einige Beispiele angeführt, in denen in aneuploiden Kernen im Verlauf einer abnormalen Meiosis ebenfalls die Aussonderung eines oder mehrerer Genome zu beobachten war. In der oktoploiden

Versuchspflanze Nr. 12/58 war eine *hypodiploide* PMZ mit 20 Chromosomen vorhanden, die in der 1. Anaphase eine Verteilung von 12 + 8 erfuhren. In einer Anthere der ebenfalls oktoploiden Pflanze Nr. 15/58 wurden einige *hypertriploide* PMZ gefunden, in denen in der 1. Telophase die Verteilung von 36 + 4 bzw.

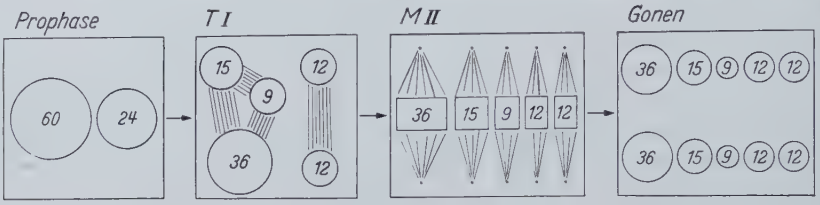



Abb. 6. Beispiel für die Entstehung triploider und haploider Gonen in einer hochpolyploiden aneuploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 15. Die Zelle besitzt bereits in der 1. Prophase 2 selbständige Kerne unterschiedlicher Valenz. Durch eine bi- und eine tripolare Spindel entstehen nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung 5, nach Beendigung der Meiosis 10 Kerne

36 + 9 — d. h. genomatisch die Kombination $3n$ + Rest — zustande kam. Sie stellt wohl eine Parallele zur häufig aufgefundenen Verteilung von 36 + 12 in der 1. Telophase tetraploider PMZ dar. In der tetraploiden Versuchspflanze 18/58 traten vereinzelt *pentaploide* PMZ auf, die in TI eine Verteilung von 48 + 12, also von $4n + n$ zeigten (Abb. 7). Eine pentaploide PMZ der oktoploiden Versuchspflanze 15/58 enthielt in der Interkinese 3 Kerne mit den Chromosomenzahlen 24 + 24 + 12. Es liegt nahe, hier die Mitwirkung einer tripolaren Spindel in der 1. Anaphase anzunehmen, wie sie in den PMZ abregulierender polyploider Tomaten häufig zu beobachten sind. Im allgemeinen erfolgt die Chromosomenverteilung aus tripolaren Äquatorialplatten nach Zufallsgesetzen; die Telophase-Kombination von 24 + 24 + 12 (Pflanze Nr. 15/58), 24 + 12 + 4 (Pflanze Nr. 18/58), 12 + 12 + 9 (Pflanze Nr. 75/56) oder 24 + 12 + 16 + 3 (Pflanze Nr. 21/58) scheinen jedoch außerhalb einer zufälligen Chromosomenverteilung zu liegen, hier sind vielmehr Genomsonderungen zustande gekommen. Das gleiche gilt für eine *heptaploide* PMZ der tetraploiden Versuchspflanze 18/58, die in der 2. Metaphase 3 Kerne mit den Valenzen $4n + 2n + n$ ausbildete. Ein sehr deutlicher Fall der Aussonderung von Genomen ist in Abb. 8 wiedergegeben: in einer heptaploiden PMZ der oktoploiden Pflanze Nr. 15/58 werden 4 Gonen mit den Valenzen $n + n$ (oben) und $n + 4n$ (unten) gebildet.

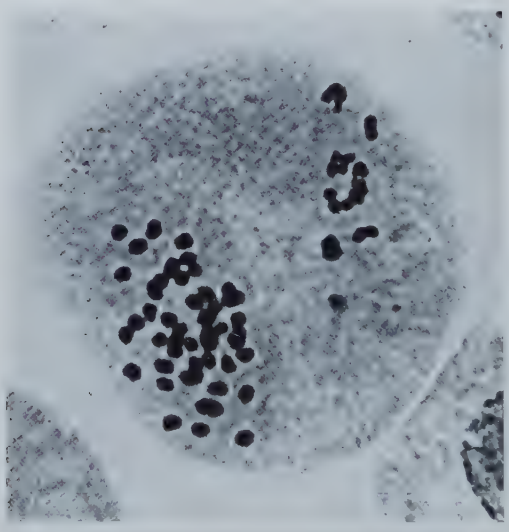


Abb. 7. Zweite Metaphase einer pentaploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 18 mit der Chromosomenverteilung von 12 + 48 ( $n + 4n$). (2200fach)

In hypo-oktoploiden PMZ konnten ganz entsprechende Einregulierungsvorgänge beobachtet werden. So lief in einer 90chromosomigen PMZ der okto-

ploiden Versuchspflanze Nr. 16/58 nicht die Bildung von 4 etwa 45chromosomigen Gonen ab, es entstanden vielmehr Tetradenkerne mit den Chromosomenzahlen 48 + 48 + 39 + 39; der Rest von 6 Chromosomen war nicht mit in die Tetradenkerne einbezogen worden. In Abb. 9 ist eine hypo-oktoploide Zelle der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 75 dargestellt, die insgesamt 13 Gonen zur Ausbildung bringt, von denen 4 die diploide Chromosomenzahl besitzen (Pfeile). Schließlich sei noch eine Zelle erwähnt, die in der 2. Telophase insgesamt mehr als 150 Chromosomen enthielt; sie lagen in Form von 5 Kernen mit den Valenzen $4n + 4n + 2n + 2n + n$ vor.

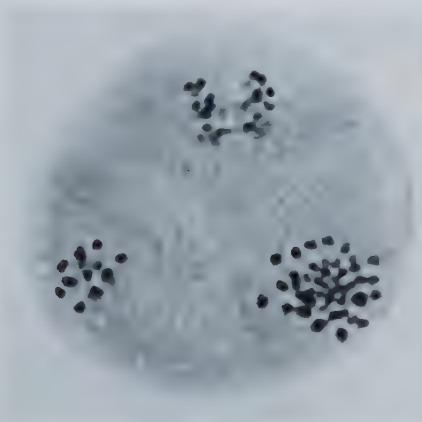


Abb. 8

Abb. 9

Abb. 8. Heptaploide PMZ der oktoploiden Pflanze Nr. 75. In der 2. Telophase sind 4 Kerne mit den Valenzen $n + n$ (oben) und $n + 4n$ (unten) vorhanden. Die Meiosis ist hier eindeutig nach genomatischen und nicht nach rein zahlenmäßigen Gesichtspunkten verlaufen (1200fach)

Abb. 9. Hypooktoploide PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 75. Es werden insgesamt 13 Gonen gebildet, von denen 4 die diploide Chromosomenzahl besitzen (Pfeile; 1200fach)

Es ist nicht möglich, auf die vielen ähnlich gelagerten Fälle der bearbeiteten Versuchspflanzen einzeln einzugehen. In den Antheren von 13 tetra- und oktoploiden Tomaten wurden mehr als 230 PMZ analysiert, in denen derartige Einregulierungsvorgänge abgelaufen waren. In den Tabellen 1 und 2 sind einige Beispiele zusammengestellt. Interessanterweise hat Gläss (1957, 1958) bei aneuploiden Mitosen der Rattenleber ganz entsprechende Befunde erhalten, auch dort werden Genome ausgesondert, und es bleibt eine aneuploide Restgruppe zurück. Wenn diese Abnormalitäten auch nicht mit dem Abregulierungsproblem in unserem Sinne in Verbindung stehen, so zeigen sie doch, daß in sich teilenden tierischen Geweben prinzipiell die gleichen gesetzmäßig abweichenden Vorgänge realisiert sein können wie in der Meiosis abregulierender Pflanzen.

Schließlich seien noch einige Fälle erwähnt, in denen ganz offensichtlich regulative Vorgänge abgelaufen sind, von denen jedoch nur die Endstadien der Meiosis erfaßt werden konnten, eine Rekonstruktion der abweichenden meiotischen Teilungsabläufe war nicht möglich. So waren in einigen anscheinend *hypodiploiden* Gonotokonten der tetraploiden Pflanze Nr. 15/58 jeweils drei 12chromosomige Gonen vorhanden. Eine *hyperdiploide* PMZ der tetraploiden Pflanze Nr. 934 besaß gegen Ende der Meiosis ebenfalls nur 3 Kerne, und zwar mit den Chromosomenzahlen 12 + 12 + 36. Diese Anordnung geht möglicherweise

Tabelle 1. *Übersicht über die abweichenden Chromosomenverteilungen in der Meiosis triploider, hyperdiplo- und -triploider sowie hypotetraploider PMZ abregulierender polyploider Tomaten* (12 = haploide, 24 = diploide Chromosomenzahl)

| Kombination | Meiotisches Stadium | Nr. der Versuchspflanze | Valenz der PMZ | Hauptvalenz der Pflanze |
|---|---|---|---|---|
| 12+12+12 | JI | 18, 1412 | triploid | 4*n* |
| 24+24+24 | TII, JII | 934, 1412 | triploid | 4*n* |
| 24+12 | TI—MII | alle Pflanzen | triploid | 4*n* |
| 24+24+12+12 | TII | alle Pflanzen | triploid | 4*n* |
| 12+12+12+5 | TI—MII | 18 | hypertriploid | 4*n* |
| 24+24+24+1 | TII | 934 | hypertriploid | 4*n* |
| 24+24+24+Rest (5—17 Chromosomen) | TII | 40, 934, 1412 | hypertriploid | 4*n* |
| 24+24+18+9 | TII | 21, 934 | hypertriploid | 4*n* |
| 24+12+4 | JI | 18 | hypertriploid | 4*n* |
| 24+24+12+12+Rest | TII | 934 | hypertriploid | 4*n* |
| | | 15 | hypertriploid | 8*n* |
| 36+4; 36+6+3 | JI | 15 | hypertriploid | 8*n* |
| 12+16 | TI—MII | 14, 934 | hyperdiploid | 4*n* |
| 12+17+1 | MII | 1 | hyperdiploid | 8*n* |
| 12+12+4+5 | MII | 75 | hyperdiploid | 8*n* |
| 12+12+12+12+Rest | TII | 18 | hyperdiploid | 4*n* |
| | | 16 | hyperdiploid | 8*n* |
| 24+17; 24+9+5+4 | TI—MII | 14, 18, 934 | hypotetraploid | 4*n* |
| 24+6; 24+7 | TI—MII | 18, 934 | hypotetraploid | 4*n* |
| 24+20 | MII | 75 | hypotetraploid | 8*n* |
| 24+24+9+9 | JII | 934 | hypotetraploid | 4*n* |
| 24+24+17+11; 24+24+16+4 | JII | 934 | hypotetraploid | 4*n* |
| 24+12+12+12+16 | TII | 18 | hypotetraploid | 4*n* |
| 24+12+12+12+3 | TII | 16 | hypotetraploid | 8*n* |
| 36+24+24+6 | TII | 934 | hypotetraploid | 4*n* |

Tabelle 2. *Übersicht über die abweichenden Chromosomenverteilungen in der Meiosis hypertetraploider und hypooktoploider PMZ abregulierender polyploider Tomaten* (24 = diploide, 48 = tetraploide Chromosomenzahl)

| Kombination | Meiotisches Stadium | Nr. der Versuchspflanze | Valenz der PMZ | Hauptvalenz der Pflanze |
|---|---|---|---|---|
| 24+24+4 | MII | 15 | hypertetraploid | 8*n* |
| 24+24+Rest (8—20 Chromosomen) | MII | 1, 4 | hypertetraploid | 8*n* |
| 24+24+degenerierende Chromosomen | JI | 934 | hypertetraploid | 4*n* |
| 24+24+24+24+Rest | TII | 21 | hypertetraploid | 4*n* |
| | JII | 75 | hypertetraploid | 8*n* |
| 12+48 | TI | 18 | pentaploid | 4*n* |
| 24+24+12 | JI | 15 | pentaploid | 8*n* |
| 36+30 | MII | 75 | hypohexaploid | 8*n* |
| 48+48+39+39+4+2 | TII | 16 | hypooktoploid | 8*n* |
| 48+48+24+24+12 | JII | 21 | hypooktoploid | 4*n* |

auf die mehrfach beobachtete Verteilung von 12 + 18 Chromosomen in TI bzw. MII zurück. Während im 12chromosomigen Tochterkern die Meiosis normal verläuft, werden im 18chromosomigen Tochterkern die Chromatiden zu einem Restitutionskern vereinigt. Die Bildung von Restitutionskernen trat in abregulierenden Antheren unseres polyploiden Versuchsmaterials häufig auf.

So vielgestaltig die beschriebenen empirischen Befunde auch sein mögen, überall wird die Tendenz erkennbar, im Zuge einer atypisch verlaufenden Meiosis

in chromosomal unbalancierten Zellen euploide Chromosomengruppen auszusondern und damit balancierte Verhältnisse zu schaffen.

Es sei darauf hingewiesen, daß in dem bearbeiteten Material auch aneuploide Pflanzen bzw. Pflanzenregionen vorhanden waren, in denen im Verlauf der Meiosis keine Aussonderung von Genomen zu beobachten war. In der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934 waren in Verbindung mit einem Kälteschock einige Knospen mit Chromosomenzahlen von $2n = 77$ entstanden, einer Valenz also, die zwischen $6n$ und $7n$ liegt. Soweit in den Antheren dieser Pflanzenregion Teilungsstadien erfaßt werden konnten, verlief die Meiosis in voller Präzision, und zwar ganz eindeutig nach dem Prinzip der *zahlenmäßigen Reduktion* und nicht nach genomatischen Gesichtspunkten. Das gleiche gilt für die hypotetraploide Versuchspflanze Nr. 100/56, bei der keine Einregulierungsvorgänge beobachtet werden konnten; die Pflanze war völlig pollensteril. Es müssen also offenbar spezifische physiologische Bedingungen realisiert sein, wenn polyploide PMZ mit Ab- bzw. Einregulierungsprozessen reagieren sollen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zell- oder sogar kernphysiologische Ursachen, es wäre aber ebensogut denkbar, daß sie auf einzelne Zellen des Tapetums zurückgehen.

## D. Theoretischer Teil

Im allgemeinen zeigt die Meiosis triploider Organismen einen prinzipiell normalen Verlauf. Wegen des Vorhandenseins von Tri- und Univalenten in der meiotischen Prophase sind zwar bereits in der ersten meiotischen Teilung Verteilungsstörungen zu erwarten, meist werden jedoch je PMZ 4 Gonen mit etwa übereinstimmenden Chromosomenzahlen gebildet, die wegen ihrer genomatischen Unbalance zur Sterilität der betreffenden Keimzellen führen. Das gilt auch für triploide Tomaten (Lesley und Mann 1925, M. M. Lesley 1926, J. W. Lesley 1928, Upcott 1935, Rick 1945).

In den Antheren experimentell erzeugter tetraploider Tomaten finden sich in geringer Häufigkeit triploide PMZ, die offenbar in Verbindung mit prämeiotischen Abregulierungsvorgängen aus tetraploiden Archesporzellen entstanden sind. Es wurde bereits früher nachgewiesen, daß in der 1. Anaphase derartiger Zellen häufig die Chromosomen-Verteilung von $n+2n$ zustande kommt. Prinzipiell die gleichen Vorgänge sind in hexaploiden PMZ oktoploider Versuchspflanzen zu beobachten, die anstelle der erwarteten Anaphasenverteilung von $3n+3n$ eine solche von $2n+4n$ zeigen (Gottschalk 1958a, b). Die anfänglich nur an wenigen Versuchspflanzen erhaltenen Befunde konnten inzwischen an weiteren tetraploiden und an oktoploiden Organismen bestätigt werden, so daß angenommen werden kann, daß es sich hierbei um allgemeingültige regulative Prozesse handelt. Darüber hinaus traten in triploiden PMZ tetraploider Tomaten neue meiotische Regulierungsvorgänge auf, die in der Folge diskutiert werden sollen.

### *1. Die Entstehung von 3 diploiden Gonen aus einer triploiden PMZ*

Im empirischen Teil der Arbeit wurde für die tetraploiden Versuchspflanzen Nr. 1412 und 934 ein bisher nicht bekannter Einregulierungsmodus beschrieben, in dessem Verlauf aus triploiden PMZ jeweils 3 diploide Gonen entstehen. Dieser Vorgang wurde in einigen tetraploiden Antheren nahezu bei allen vorhandenen triploiden PMZ beobachtet und kann daher nicht als zufällige meiotische Unregelmäßigkeit betrachtet werden. Leider waren in den fraglichen Antheren fast nur Stadien der 2. meiotischen Teilung vorhanden, so daß es nicht möglich war, den meiotischen Stadienablauf aufzuklären, der diesem Vorgang zugrunde liegt. Da das Phänomen als solches äußerst selten auftritt, besteht kaum die Möglichkeit, die fehlenden meiotischen Stadien in tetraploiden Antheren planmäßig zu suchen, man ist vielmehr — wie bei allen bisher erarbeiteten Kenntnissen über das Phänomen der Abregulierung — auf Zufallsbeobachtungen angewiesen. Im folgenden soll der Versuch einer Deutung dieser Vorgänge gemacht werden.

Es ist auffällig, daß in den beiden Antheren, in denen in relativ großer Anzahl die Bildung von 3 diploiden Gonen in triploiden PMZ beobachtet wurde, in geringer Häufigkeit Gonotokonten auftraten, die in der 1. Telo- oder Interphase drei 12chromosomige Kerne enthielten. Wir haben nun bei abregulierenden Pflanzen in großer Häufigkeit Spindelanomalien beobachten können, darunter das Auseinanderweichen von Spalthälften in der 2. meiotischen Teilung, ohne daß eine Spindelbildung zustande kam. Die Folge davon ist die Bildung von Kernen mit erhöhten Chromosomenzahlen (Abb. 10). Es kann wohl als gesichert angenommen werden, daß die drei 24chromosomigen Gonen der fraglichen PMZ zunächst auf drei

Abb. 10

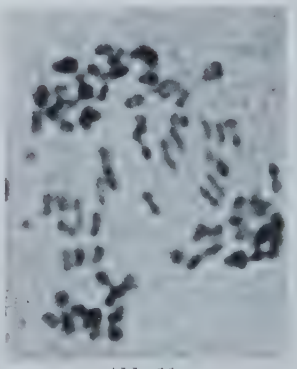


Abb. 11

Abb. 10. Zweite Telophase einer triploiden PMZ der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934. Die Trennung der Chromosomen in ihre Spalthälften ist erfolgt, die Spindelbildung ist jedoch in beiden Teilungen unterblieben. Aus der PMZ entsteht nur eine Gone mit 72 Chromosomen ($= 6n$), (850fach)

Abb. 11. Späte 1. Anaphase einer PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 16. In Verbindung mit einer tripolaren Spindel werden 3 Tochterkerne gebildet (2600fach)

12chromosomige Kerne der späten 1. Teilung zurückzuführen sind. Die entscheidende Frage liegt nun darin, wie aus der 1. Metaphase einer triploiden PMZ 3 haploide Telophasenkerne entstehen können. Es liegt nahe, hierfür die Mitwirkung einer *tripolaren Spindel* anzunehmen. Ich möchte in diesem Zusammenhang betonen, daß in den Antheren abregulierender polyploider Tomaten häufig tripolare Spindeln aufgefunden wurden, daß sich diese Annahme also generell mit den empirischen Befunden deckt (Abb. 11). Es besteht kein Zweifel, daß der zur Diskussion stehende Vorgang nicht mit anderen, in den gleichen Antheren feststellbaren meiotischen Unregelmäßigkeiten auf eine Stufe gestellt werden kann, wir müssen als Ursache dieser Vorgänge vielmehr einen für die Meiosis bisher noch nicht bekannten festen Modus annehmen. Ich möchte hierzu die folgende Arbeitshypothese entwickeln.

Die exakte Einordnung der Bivalente in die Äquatorialplatte der 1. meiotischen Teilung wird allgemein als Folge des Zusammenwirkens der Centromere mit bestimmten Elementen der bipolaren Spindel aufgefaßt. Die bipolare Lage von Chromosomen in der Äquatorialplatte kommt nicht nur bei den vollhomologen Chromosomen eines Bivalents zustande, sie kann häufig auch bei benachbarten halbhomologen Chromosomen in ring- oder kettenförmigen Verbänden beobachtet werden, die als Folge reziproker Translokationen auftreten (vgl. etwa die Ver-

hältnisse bei den Oenotheren). Wir können die in bestimmten Teilungsstadien in Erscheinung tretende Bipolarität einer PMZ folglich als eine der Grundvoraussetzungen für den ordnungsgemäßen Ablauf der Meiosis ansehen. Wenn wir nun annehmen, daß in der 1. Prophase einer *triploiden* PMZ vorwiegend *Trivalente* gebildet werden und daß die Einordnung dieser Trivalente in die Äquatorialplatte in Verbindung mit einer *tripolaren Spindel* erfolgt, so wäre es gut möglich, daß jedes der 3 Homologen eines Trivalents in einen anderen Kern gelangt (Abb. 12). Es würden auf diese Weise in der 1. Telophase die mehrfach beobachteten 3 haploiden Kerne entstehen, in denen im weiteren Verlauf dieser abnormalen Meiosis durch endomitose-artige Vorgänge eine Erhöhung der Genomstufe vom haploiden zum diploiden Zustand erfolgt. Das Auftreten einiger Uni- und Bivalente in der Prophase würde zu geringen meiotischen Störungen führen,

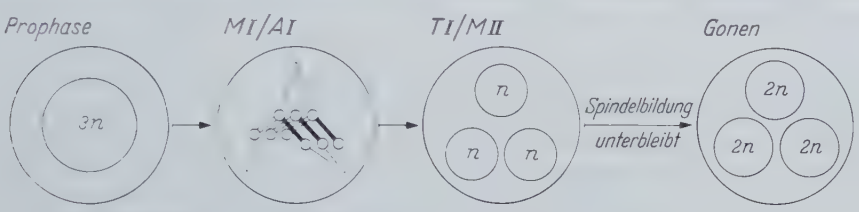



Abb. 12. Die Entstehung von 3 diploiden Gonen aus einer triploiden Pollenmutterzelle (Erläuterung im Text)

als deren Folge geringe Schwankungen der Chromosomenzahlen in den Gonen auftreten müßten. Derartige Schwankungen wurden gefunden, jedoch nur selten, so daß man bei Anwendung der eben formulierten Arbeitshypothese annehmen müßte, daß in den fraglichen PMZ ausschließlich oder doch vorwiegend Trivalente gebildet werden.

Über die Meiosis autotriploider Organismen liegt eine umfangreiche Literatur vor. Nach Tischler (1951, 1953) können die Triploiden hinsichtlich des Paarungsverhaltens der 3 Homologen eines jeden Chromosomentypus in der meiotischen Prophase in 2 Gruppen unterteilt werden: Beim *Morus*-Typus treten Uni-, Bi- und Trivalente auf, während die Objekte des *Canna*-Typus nur Trivalente bilden. Der reine *Canna*-Typus ist sehr selten vertreten, es werden diesem Typus jedoch auch diejenigen Objekte zugeordnet, bei denen vorwiegend Trivalente zur Ausbildung gelangen. Die Anzahl der bisher bekannten Objekte des *Canna*-Typus, die als Stütze meiner oben formulierten Arbeitshypothese herangezogen werden können, ist groß. Es sind in diesem Zusammenhang folgende Arbeiten zu nennen: Belling (1921, 1925a, b), Belling und Blakeslee (1922, 1923), Darlington (1929), Newton und Darlington (1929), Müntzing (1932 33), Stone und Mather (1932), King (1933), Olmo (1934), Yasui (1935), Yamamoto (1936), Satina und Blakeslee (1937a, b), Smith (1938), Levan (1942), Myers (1944), Ogata und Haga (1956); weitere Literaturangaben sind bei Tischler (1951, 1953) zu finden.

Bei dem von uns bearbeiteten Objekt — der Tomate — liegen Untersuchungsergebnisse über das Paarungsverhalten der Homologen in der Meiosis triploider Organismen von Lesley (1926), Upcott (1935) und Rick (1945) vor. Die Befunde der 3 Autoren stimmen nicht überein. Während im triploiden Material von Upcott die Anzahl der Trivalente je PMZ zwischen 3 und 7 variierte, traten im Material von Lesley und Rick gewöhnlich 12 Trivalente je Zelle auf. Das Objekt *Lycopersicon esculentum* zeigt also kein einheitliches Verhalten, es kann vielmehr bei Berücksichtigung verschiedener Genotypen sowohl der *Morus*- als auch der *Canna*-Typus verwirklicht sein. Ganz analoge Befunde liegen auch für einige andere Arten vor (vgl. Tischler 1951, S. 553).

Es wäre durchaus denkbar, daß die abregulierende tetraploide Versuchspflanze Nr. 1412, in deren Antheren häufig triploide PMZ auftreten, den *Canna*-Typus

verwirklicht, daß hier also ausschließlich oder überwiegend Trivalente gebildet werden. Kommt in den fraglichen PMZ zusätzlich noch die bei fast allen bearbeiteten abregulierenden Pflanzen oft beobachtete Ausbildung einer tripolaren Spindel hinzu, so sind die beiden Voraussetzungen unserer Interpretation der erhaltenen Befunde gegeben.

Durch die eben formulierte Arbeitshypothese werden abweichende meiotische Bilder verständlich, die sonst nur schwer zu deuten sind. In einer Anthere der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934 traten mehrfach PMZ auf, die in der 2. Telophase nur 3 Kerne mit den Chromosomenzahlen 24 + 24 + 8 bzw. 24 + 24 + 10 oder ähnliche Verteilungen besaßen. Diese Zellen sind wohl als hypotriploide Gonotokonten aufzufassen, in denen die Meiosis nach dem gleichen abweichenden Modus abgelaufen ist wie in den triploiden PMZ der Versuchspflanze Nr. 1412. Da hier jedoch von einigen Chromosomentypen nur 2 Homologe vorhanden sind, muß bei der tripolaren Verteilung der Chromosomen in der 1. Anaphase neben 2 haploiden Kernen ein 3. Kern mit weniger als 12 Chromosomen entstehen. Von besonderem Interesse dürfte die eben formulierte Arbeitshypothese jedoch im Zusammenhang mit einem Befund von Huskins (1934) sein: Er fand in der Nachkommenschaft einer rein triploiden Tomate ausschließlich tetraploide Pflanzen, konnte jedoch keine Erklärung für diesen unerwarteten Befund geben. Die Vorgänge, die diesen Beobachtungen zugrunde liegen, entsprechen im Prinzip unseren Befunden. Wenn in den PMZ einer abnormal reagierenden triploiden Pflanze grundsätzlich jeweils 3 diploide Gonen gebildet werden, und wenn in den Embryosack-Mutterzellen die entsprechenden Vorgänge ablaufen, so wird bei Selbstbefruchtung einer derartigen Pflanze nur die Vereinigung diploider Keimzellen möglich sein, die zu tetraploidem Saatgut führen muß. Es wird dadurch nicht nur die Fertilität der triploiden Mutterpflanze, sondern auch das ausschließliche Auftreten tetraploider Nachkommen verständlich.

Es sei erwähnt, daß Dermen (1931) in den PMZ triploider Organismen von *Petunia* nach Abschluß der Meiosis sehr selten Triaden gefunden hat, deren Entstehung er jedoch nicht beobachten konnte. Angaben über die chromosomalen Verhältnisse in diesen Triaden sind nicht gemacht, so daß nicht entschieden werden kann, ob bei diesem Objekt ähnliche Vorgänge abgelaufen sind wie bei unseren abregulierenden Tomaten.

Das Vorkommen tetraploider Pflanzen in der Nachkommenschaft triploider Organismen ist häufig zu beobachten, ohne daß hierbei Regulierungsvorgänge eine Rolle spielen. Die Verteilung der Chromosomen in der 1. Anaphase triploider Pflanzen erfolgt i. a. zufallsgemäß, hierbei werden in geringer Häufigkeit haploide und diploide Gonen gebildet (Lesley 1926, Capinpin 1933, Satina und Blakeslee 1937a, Lamm 1944). Es kann nun vorkommen, daß nach Selbstung einer triploiden Pflanze eine der wenigen vorhandenen diploiden Eizellen von einem diploiden spermatogenen Kern befruchtet wird und daß dadurch eine tetraploide Zygote entsteht (Nebel 1933, Janaki-Ammal 1934). Außerdem ist mit positiven Selektionsvorgängen von haploiden und diploiden Gameten zu rechnen. Dadurch treten trotz der zufallsmäßigen Verteilung der Chromosomen in der 1. Anaphase in der Nachkommenschaft triploider Organismen bzw. bei Verwendung von Triploiden als Kreuzungspartner relativ häufig diploide bzw. tetraploide Organismen auf (Lesley 1928; Levan 1936, 1942; Satina und Blakeslee 1937b; Bergström 1938, 1940; Johnsson 1940, 1942; Perlova 1940; Lamm 1944; Myers 1944). Es sei erwähnt, daß die Erzeugung tetraploider Formen aus Triploiden in der Obstzüchtung direkt zu einer Zuchtmethode entwickelt worden ist. Bei triploiden Äpfeln treten vereinzelt unreduzierte — also triploide — Gameten auf, die nach Kreuzung mit normalen diploiden Formen tetraploide Zygoten und damit Nachkommen ergeben (Müntzing 1936, Nilsson-Ehle 1938). Ähnliche Verhältnisse liegen offenbar bei *Populus* vor (Johnsson 1940, 1942).

In allen eben zitierten Fällen ist das Auftreten tetra- oder diploider Organismen in der Nachkommenschaft triploider Pflanzen auf *zufällige* meiotische Abnormalitäten (unreduzierte Gameten) bzw. auf die *zufällige* Abweichung von der üblichen zahlenmäßigen Chromosomenverteilung in der 1. meiotischen Anaphase ($n + 2n$) zurückzuführen, eine Beziehung zur Abregulierung besteht hierbei offenbar nicht. Bei unseren Befunden hingegen handelt es sich um *gesetzmäßige meiotische Abweichungen*, die mit größter Wahrscheinlichkeit dem Komplex der Abregulierungsvorgänge zuzuordnen sind.

*2. Das grundsätzliche Verhältnis von Meiosis und meiotischer Abregulierung*

Unsere bisherigen Untersuchungen zum Problem der Abregulierung haben neben den rein regulativen Prozessen noch in anderer Beziehung ein völlig unerwartetes Ergebnis erbracht, das sich auf die Meiosis als biologisches Grundphänomen bezieht. Es sind zwar in der Fachliteratur als Folge veränderter innerer und äußerer Bedingungen meiotische Abnormalitäten vielfältiger Art bekanntgeworden, im großen ganzen läuft die Meiosis jedoch bei pflanzlichen und tierischen Organismen — und zwar bei Protisten, soweit sie zu sexueller Fortpflanzung befähigt sind, wie auch bei den höchstentwickelten pflanzlichen und tierischen Formen sowie beim Menschen — prinzipiell übereinstimmend ab. *Unsere Befunde, die lediglich im Rahmen eines engen biologischen Teilgebiets erhalten wurden, zeigen nun, daß die Meiosis ein äußerst variabler Vorgang sein kann, der bereits bei Berücksichtigung weniger Versuchspflanzen der gleichen Art zu mannigfaltigen Änderungen befähigt ist.* Der entscheidende Unterschied dieser Änderungen zu den oben erwähnten meiotischen Unregelmäßigkeiten liegt darin, daß sie offenbar *gesetzmäßiger* Natur sind und uns in biologischer Beziehung sinnvoll erscheinen, denn sie führen wie die normale Meiosis zu funktionsfähigen Endprodukten. Ihr wiederholtes Auftreten bei verschiedenen Organismen zeigt darüber hinaus, daß es sich um *konstante*, unter bestimmten inneren Bedingungen *reproduzierbare* Vorgänge handelt. Es ist daher meiner Ansicht nach unangebracht, wenn wir die im Zusammenhang mit der Abregulierung aufgefundenen abweichenden meiotischen Befunde als „Abnormalitäten" oder „meiotische Störungen" bezeichnen und sie damit der Gruppe der oben genannten „meiotischen Unregelmäßigkeiten" zuordnen. Es erscheint mir vielmehr angebracht, *sie als von der Norm abweichende reguläre Teilungszyklen zu interpretieren und sie damit als biologisch vollwertige, wenn auch nur selten ablaufende Vorgänge neben Mitosis und Meiosis zu stellen.*

Ich möchte die im Zusammenhang mit der Abregulierung erhaltenen Befunde in folgende Arbeitshypothese einordnen: In der jungen Anthere laufen als Reaktion auf bestimmte, im einzelnen noch nicht analysierte physiologische Bedingungen zunächst ununterbrochen Mitosen ab. Eine Änderung dieser Bedingungen führt zur Umschaltung von Mitosis auf Meiosis, und zwar auf Meiosis mit „normalem" Stadienablauf. Die physiologischen Vorgänge, die zu dieser Umschaltung führen, sind noch nicht bekannt, sie werden aber in der ganzen Anthere bzw. in allen Antheren der gleichen Blüte etwa gleichzeitig wirksam und haben zur Folge, daß die Meiosis in allen PMZ einer Blüte etwa gleichzeitig und völlig gleichartig abläuft. In den jungen Antheren experimentell erzeugter polyploider Pflanzen kann nun als Reaktion auf abnormale physiologische Bedingungen in Einzelzellen oder kleinen Bezirken eine Umschaltung von normaler Mitose auf eine

gesetzmäßig abweichende Form der Mitose bzw. von normaler Mitose auf eine gesetzmäßig abweichende Form der Meiose erfolgen. Sollte sich diese Interpretation als zutreffend erweisen, so müßten wir mit dem Vorhandensein mehrerer gleichwertiger Modifikationen der Meiosis rechnen, die sich nur in der Häufigkeit unterscheiden, in der sie auftreten. Prinzipiell die gleichen Verhältnisse dürfen bei der Mitose vorliegen.

Unsere bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, daß Abregulierungsvorgänge in vielen, möglicherweise sogar generell in allen experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen ablaufen, daß ihre Häufigkeit jedoch so gering ist, daß sie praktisch nicht zur Bildung diploider Nachkommen führen. Nur bei wenigen cytologisch besonders labilen Pflanzen häufen sich diese Vorgänge; es werden Keimzellen mit der rückregulierten Chromosomenzahl in so großer Menge gebildet, daß sie Befruchtungschancen haben. In der Nachkommenschaft derartiger Organismen können dann diploide Pflanzen in mehr oder minder großer Anzahl auftreten. Eine Überprüfung dieser Hypothese ist nur möglich, wenn Objekte gefunden werden, in denen die Abregulierungsvorgänge häufiger als bisher ablaufen. Diese wesentlichste Voraussetzung einer erfolgreichen Weiterbearbeitung der vorliegenden Fragestellung kann theoretisch auf 2 verschiedenen Wegen erreicht werden: Durch die Einbeziehung einer großen Anzahl verschiedener Arten in unser Versuchsprogramm sollen Species gefunden werden, die im tetraploiden Zustand eine geringe cytologische Stabilität aufweisen, bei denen also die Anzahl abregulierender Pflanzen höher ist als bei den bisher bearbeiteten Objekten. Zum zweiten sollen hochpolyploide Organismen erzeugt und analysiert werden. Unsere Untersuchungen an polyploiden Tomaten mit den Valenzen $4n$, $8n$ und $16n$ (GOTTSCHALK 1958b, 1959) haben gezeigt, daß die cytologische Stabilität mit zunehmendem Polyploidiegrad abnimmt. In einer hochpolyploiden Pflanze laufen also abweichende cytologische Vorgänge in relativ großer Häufigkeit ab, die wenigstens zum Teil prinzipiell mit den Abregulierungsvorgängen in tetraploiden Pflanzen übereinstimmen dürften. Leider eignen sich nur wenige Objekte für die Erzeugung hoher Polyploidiestufen. Da bei diesen Objekten auch bestimmte cytologische Voraussetzungen erfüllt sein müssen (relativ niedrige Chromosomenzahl, nicht zu kleine Antheren, relativ hohe Anzahl von PMZ je Anthere, Selbstbefruchter u. a.), ist der Kreis geeigneter Objekte nicht groß. Unsere Untersuchungen werden in beiden Richtungen weitergeführt.

## Zusammenfassung

Es wurden insgesamt 13 zur Abregulierung neigende experimentell erzeugte tetra- und oktoploide Versuchspflanzen von *Lycopersicon esculentum* cytologisch bearbeitet. Die Untersuchung der Meiosis triploider und aneuploider PMZ erbrachte folgende Ergebnisse:

1. In einigen Antheren der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 1412 traten auffallend viele triploide PMZ auf, in denen als Folge eines atypischen Verlaufs der Meiosis fast durchgängig 3 diploide Gonen je Gonotokont gebildet wurden. Der Befund konnte an anderen tetraploiden Versuchspflanzen bestätigt werden.

2. In aneuploiden PMZ mit Chromosomenzahlen zwischen $3n$ und $4n$ wurden ebenfalls bevorzugt 3 diploide Gonen gebildet; der Rest der vorhandenen Chromosomen lag in Form eines kleinen 4. Kerns vor, der in einigen Fällen degenerierte.

3. Die gleichen Vorgänge traten nach Berücksichtigung einer größeren Anzahl polyploider Versuchspflanzen in vielen aneuploiden PMZ mit Chromosomenzahlen von der hypodiploiden bis zur hypooktoploiden Valenz auf, neben aneuploiden Restgruppen wurden Kerne mit der haploiden oder diploiden Chromosomenzahl gebildet. In den fraglichen Zellen verlief die Meiosis eindeutig nicht nach dem Prinzip der zahlenmäßigen Reduktion, sondern nach genomatischen Gesichtspunkten. Dadurch kommt in den aneuploiden Zellen eine Einregulierung zustande, die zu chromosomal balancierten, offenbar befruchtungsfähigen Keimzellen führt.

4. Aus unseren Untersuchungsergebnissen kann geschlossen werden, daß cytologische Abregulierungsvorgänge in vielen, vielleicht in allen experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen ablaufen, jedoch in so geringer Häufigkeit, daß sie nicht zur Bildung diploider Nachkommen führen. Erst wenn sich diese Vorgänge in einem Organismus häufen, tritt das Phänomen der Abregulierung in seiner Nachkommenschaft in Erscheinung.

5. Die bisher erarbeiteten vielfältigen Ab- und Einregulierungsmechanismen können nicht als meiotische Unregelmäßigkeiten im üblichen Sinne betrachtet werden. Da sie nach festen teilungsmechanischen Gesetzmäßigkeiten ablaufen und in geringer Häufigkeit offenbar allgemein verbreitet sind, sind sie eher als Modifikationen der normalen Meiosis aufzufassen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

## Literatur

Belling, J.: The behavior of homologous chromosomes in a triploid *Canna*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **7**, 197—201 (1921). — Homologous and similar chromosomes in diploid and triploid hyacinths. Genetics **10**, 59—71 (1925). — Chromosomes of *Canna* and of *Hemerocallis*. J. Hered. **16**, 456—466 (1925). — Belling, J., and A. F. Blakeslee: The assortment of chromosomes in triploid Daturas. Amer. Naturalist. **56**, 339—346 (1922). — The reduction division in haploid, diploid, triploid and tetraploid Daturas. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **9**, 106—111 (1923). — Bergström, J.: Tetraploid apple seedling obtained from a progeny of triploid varieties. Hereditas (Lund) **24**, 210—215 (1938). — On the progeny of diploid × triploid *Populus tremula* with special reference to the occurrence of tetraploidy. Hereditas (Lund) **26**, 191—201 (1940). — Capinpin, J. M.: Studies on the genetics and cytology of triploid Oenotheras. Cytologia (Tokyo) **4**, 355—426 (1933). — Darlington, C. D.: Meiosis in polyploids. II. Aneuploid hyacinths. J. Genet. **21**, 17—56 (1929). — Dermen, H.: Polyploidy in *Petunia*. Amer. J. Bot. **18**, 250—261 (1931). — Gläss, E.: Das Mitosemuster der unbehandelten Rattenleber nach Hepatektomie. Naturwiss. **44**, 639—640 (1957). — Aneuploide Chromosomenzahlen in den Mitosen der Leber verschieden alter Ratten. Chromosoma (Berl.) **9**, 269—285 (1958). — Gottschalk, W.: Untersuchungen zum Problem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen. Z. Vererb.-Lehre **89**, 52—79 (1958a). — Über Abregulierungsvorgänge bei künstlich hergestellten hochpolyploiden Pflanzen. Z. Vererb.-Lehre **89**, 204—215 (1958b). — Morphologische und cytologische Untersuchungen an experimentell erzeugten hochpolyploiden Pflanzen. Cytologia (Tokyo) 1959 (im Druck). — Hertzsch, W.: Beobachtungen an polyploider *Vicia villosa*. Z. Pflanzenzüchtung **30**, 210—217 (1951). — Huskins, C. L.: Anomalous segregations of a triploid tomato. J. Hered. **25**, 281—286 (1934). — Janaki-Ammal, E. K.: Polyploidy in *Solanum melongena* Linn. Cytologia (Tokyo) **5**, 453—459 (1934). — Johnsson, H.: Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and of crosses between them. Hereditas (Lund) **26**, 321—352 (1940). — Cytological studies of triploid progenies of *Populus tremula*. Hereditas (Lund) **28**, 306—312 (1942). — King, E.: Chromosome behavior in a triploid *Tradescantia*. J. Hered. **24**, 252—256 (1933). — Lamm, R.: Chromosome behaviour in a triploid rye plant. Hereditas (Lund) **30**, 137—144 (1944). — Lesley, J. W.: A cytological and genetical study of progenies

of triploid tomatoes. Genetics **13**, 1—43 (1928). — Lesley, J. W., and M. M. Mann: Triploidy in the tomato. Science **61**, 208 (1925). — Lesley, M. M.: Maturation in diploid and triploid tomatoes. Genetics **11**, 267—279 (1926). — Levan, A.: Zytologische Studien an *Allium schoenoprasum*. Hereditas (Lund) **22**, 1—126 (1936). — The effect of chromosomal variation in sugar beets. Hereditas (Lund) **28**, 345—399 (1942). — Müntzing, A.: Studies on meiosis in diploid and triploid *Solanum tuberosum*. Hereditas (Lund) **17**, 223—245 (1932/33). — The chromosomes of a giant *Populus tremula*. Hereditas (Lund) **21**, 383—393 (1936). — Polyploidiezüchtung. In Roemer-Rudorfs Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl., Bd. I, S. 700—731. 1957. — Myers, W. M.: Cytological studies of a triploid perenial ryegrass and its progeny. J. Hered. **35**, 17—23 (1944). — Nebel, B.: Chromosome numbers in aneuploid apple seedlings. N.Y. St. Exp. Stat. Techn. Bull. No 209, 1933. Zit. nach Nilsson-Ehle 1938. — Newton, W. C. F., and C. D. Darlington: Meiosis in polyploids. I. Triploid and pentaploid tulips. J. Genet. **21**, 1—15 (1929). — Nilsson-Ehle, H.: Darstellung tetraploider Äpfel und ihre Bedeutung für die praktische Apfelzüchtung Schwedens. Hereditas (Lund) **24**, 195—208 (1938). — Ogata, T., and T. Haga: A triploid and a translocation heterozygote in *Paeonia japonica*. Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ., Ser. E **2**, 61—66 (1956). — Olmo, H. P.: Prophase association in triploid *Nicotiana tabaccum*. Cytologia (Tokyo) **5**, 417—431 (1934). — Perlova, R. L.: Spontaneous occurrence of diploid plants in the offspring of the triploid *Solanum maglia* Schlechtd. grown in the Pamirs. C. R. Acad. Sci. URSS., N. s. **27**, 710 (1940). Ref. Züchter **13**, 94 (1941). — Rick, C. M.: A survey of cytogenetic causes of unfruitfulness in the tomato. Genetics **30**, 347—362 (1945). — Satina, S., and A. F. Blakeslee: Chromosome behavior in triploids of *Datura stramonium*. I. The male gametophyte. Amer. J. Bot. **24**, 518—527 (1937a). — Microsporogenesis and division in the pollen grain of triploid Daturas. (Abstr.) Genetics **22**, 207 (1937b). — Schwanitz, F.: Untersuchungen über den Ertrag getriebener diploider und tetraploider Gartenkresse *(Lepidium sativum)*. Züchter **13**, 155—160 (1941). — Smith, F. H.: Reduction divisions in triploid *Impatiens*. Amer. J. Bot. **25**, 651—654 (1938). — Stone, L. H. A., and K. Mather: The origin and behaviour of chiasmata. IV. Diploid and triploid *Hyacinthus*. Cytologia (Tokyo) **4**, 16—25 (1932). — Swaminathan, M. S.: Einige Verfahren für die Verwendung wilder *Solanum*-Arten zu Zuchtzwecken. Züchter **20**, 358—360 (1950). — Tischler, G.: Handbuch der Pflanzenanatomie. Bd. II: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung. 2. Aufl. Berlin 1951. — Handbuch der Pflanzenanatomie. Erg.-Bd.: Angewandte Pflanzenkaryologie. Berlin 1953. — Upcott, M.: The cytology of triploid and tetraploid *Lycopersicum esculentum*. J. Genet. **31**, 1—19 (1935). — Yamamoto, Y.: Über das Vorkommen von triploiden Pflanzen bei Mehrlingskeimlingen von *Triticum vulgare* Vill. Cytologia (Tokyo) **7**, 431—436 (1936). — Yasui, K.: Cytological studies in diploid and triploid *Hosta*. Cytologia (Tokyo) **6**, 484—491 (1935).

Dozent Dr. Werner Gottschalk, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 176

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 215—222 (1959)

The Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts

# THE NUCLEAR CYCLE IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDI**

By

R. P. Levine and C. E. Folsome

With 17 Figures in the Text

*(Received March 5, 1959)*

Genetic evidence from tetrad analysis in three species of the unicellular green alga, Chlamydomonas, suggests that meiosis in this genus is orthodox (Ebersold 1956, Ebersold and Levine 1959, Gowans 1958, Hartshorn 1955, Levine and Ebersold 1958 a, b; Lewin 1953, and Sager 1955). Cytological observations of meiosis and chromosome counts are required in order to determine whether there is agreement with genetic data for a classical meiosis and for the number of linkage groups. The present paper is concerned with observation of the nuclear events in *Chlamydomonas reinhardi* during gametic fusion, zygote maturation, and zygote germination.

*Life Cycle*: The life cycle of *C. reinhardi* has been presented in detail elsewhere (Ebersold 1956, Levine and Ebersold 1958 b, and Sager 1955). It is described here as an aid to following the events of the nuclear cycle. Haploid, vegetative cells can be maintained on agar or in liquid media. When agar-grown cells are suspended in water and illuminated each cell becomes motile by developing two flagella. Within two to four hours in the light, motile vegetative cells can act as gametes. When gametes of opposite mating type are mixed, pairs or clumps of cells form immediately. Shortly, thereafter, cells of opposite mating type begin to fuse in pairs. Ten to fifteen minutes after pairing, cell fusion is completed by the formation of a quadriflagellate zygote. After the loss of their flagella zygotes develop a thick wall and enlarge to about twice their original diameter. The zygotes require a maturation period which, on agar medium and at 25° C, is six days in length. The first eighteen hours of this period are in the light (500 foot candles from daylight fluorescent lamps) while the remaining time is in the dark. Following the maturation period, zygotes can be germinated by transferring them to fresh agar medium and placing them in the light. The germination of zygotes from crosses between wild-type strains is 90 per cent or better. The time required for germination varies from fifteen to twenty-four hours, depending in part on the genotype of the zygote. At germination the zygote wall ruptures and four, or more frequently eight, non-motile, haploid cells are extruded. These cells represent the products of meiosis and are capable of vegetative growth.

## Methods

Cytological observations were made of zygotes derived from crosses of wild type strains (137 *mating type* + and 137 *mating type* —) of *C. reinhardi* obtained originally by Professor G. M. Smith in a collection from Amherst, Massachusetts. These strains have been employed in a number of genetic studies cited in the first section of this paper.

* This work was supported by grants from the United States Public Health Service (Grant No. E 1421) and the National Science Foundation (Grant No. G 2812).

1. *The procedure for obtaining and germinating zygotes.* Two cultures of vegetative cells of opposite mating type were established in petri dishes containing a minimal agar medium supplemented with yeast extract and sodium acetate (Levine and Ebersold 1958a). After growth for 24 hours at 25° C and 500 foot candles illumination the cells were transferred again to yeast extract medium. Following a second twenty-four hour period in the light the cells were transferred to minimal agar medium where they were allowed to remain in the light for another twenty-four hours. At the end of this period the surface of the agar medium was flooded with approximately 10 ml of sterile, ion-free water and the cultures were illuminated from the side by a daylight fluorescent lamp. Cells thus treated became motile and accumulated toward the light. At frequent intervals the dishes were agitated to disperse the cells in the water and then the accumulation process was recommenced. After six to seven hours in the light approximately equal numbers of cells of both mating types were mixed for mating in a 125 ml flask where they remained in the light for twenty minutes. At the end of this time, 0.2 ml of the zygote suspension was transferred to each of twenty-five petri dishes containing minimal medium with agar at four percent instead of the usual one and a half percent. Almost immediately after plating onto this medium, the zygotes were distributed with the aid of a bent-glass rod and the water was quickly absorbed. With the absorption of the water all mating activity ceases so that it is possible to obtain a population of zygotes all of which have been formed within approximately one half hour. The plates of zygotes were next placed in the light for eighteen hours, after which they were put into the dark for the remainder of the six-day maturation period.

Cytological observations were made at various intervals from the time of mating and throughout the periods of maturation and germination. The first sample was taken from the 125 ml flask immediately after cells of opposite mating type had been mixed. Subsequent samples were removed from the agar medium; the first set at half hour intervals for the first thirteen hours and the second set every twenty-four hours until the end of the sixth day. At the end of the maturation period, zygotes were transferred to fresh minimal medium in petri dishes and placed in the light. Samples of germinating zygotes were taken and fixed at one hour intervals for the first nine hours, at ten minute intervals for the next two hours, and at half hour intervals for a final period of two hours.

The observations described here are based on four independent matings made on different days but with identical procedure.

2. *Cytological methods.* Both Feulgen and Azure-A stain were used in staining the material for cytological observations. It was found that Azure-A is superior to Feulgen for *C. reinhardi*. The procedure previous to staining was identical regardless of which stain was used, and it is summarized as follows: Zygotes were pipetted from the flask in which mating had occured or were removed from the surface of the minimal agar medium in petri dishes with a razor blade and smeared on the surface of a clean glass slide. No adhesive was necessary for either procedure. Before the smear became entirely dry the slide was immersed in Carnoy's fixative (1 part glacial acetic acid to 3 parts absolute alcohol) for a period of one to twenty-four hours. After fixation, the slide was rinsed in distilled water and the material was then hydrolized in N/1 HCl at 60° C for four and one half to five minutes. Slides were then stained with Azure-A or Feulgen stain. Staining in Azure-A, a Feulgen analogue (De Lamater 1951), required 45 to 60 minutes in a one per cent aqueous solution to which had been added five drops of thionyl chloride per 100 ml of stain. The stain must be prepared fresh each day and the concentration of thionyl chloride is critical. After staining, the slides were rinsed in distilled water, and the material was dehydrated by passage through progressively higher concentrations of ethanol from 30 to 100 per cent. Upon completion of dehydration, slides were cleared in xylol for 15 to 30 minutes and coverslips were mounted with damar.

The majority of specimens pictured were prepared as above with the exception of Figs. 14 and 15 which were stained with Feulgen. For this procedure fixation and hydrolysis was identical to that already described. After hydrolysis slides were immersed in Feulgen stain for 45 minutes and dehydrated by the freezing technique of De Lamater (1951).

3. *Photographic procedure.* All photography was done with a Zeiss microscope having a 90 X apochromatic oil immersion objective, a Zeiss 1.4 apochromatic condenser and either 20 or 25 X oculars. With the material stained with Azure-A it was found that a Wrattan filter, E-22 (yellow) enhanced the contrast between the nuclear material and the surrounding

cytoplasm. With Feulgen stained material a Wrattan, B-58 filter (green) was found to be effective in obtaining contrast.

With a distance of 73.6 cm from the photographic plate to the upper surface of the slide, and by photographic enlargement, magnifications to 4500 X were obtained as determined with a stage micrometer. The film employed was Ansco Isopan type 282 developed in DK 50, for 5 min. Enlargements were made on number 3 or 4 Koda-bromide paper and developed in D 72.

## Results

Results are shown in the Figs. 1 through 17. Figs. 1, 2 and 3, from a slide prepared by W. T. Ebersold, are of mitosis in a vegetative cell that has been photographed at slightly different focal levels. Fig. 4 is a composite photograph of the same cell utilizing two different negatives. It can be seen that the chromosome number is eight.

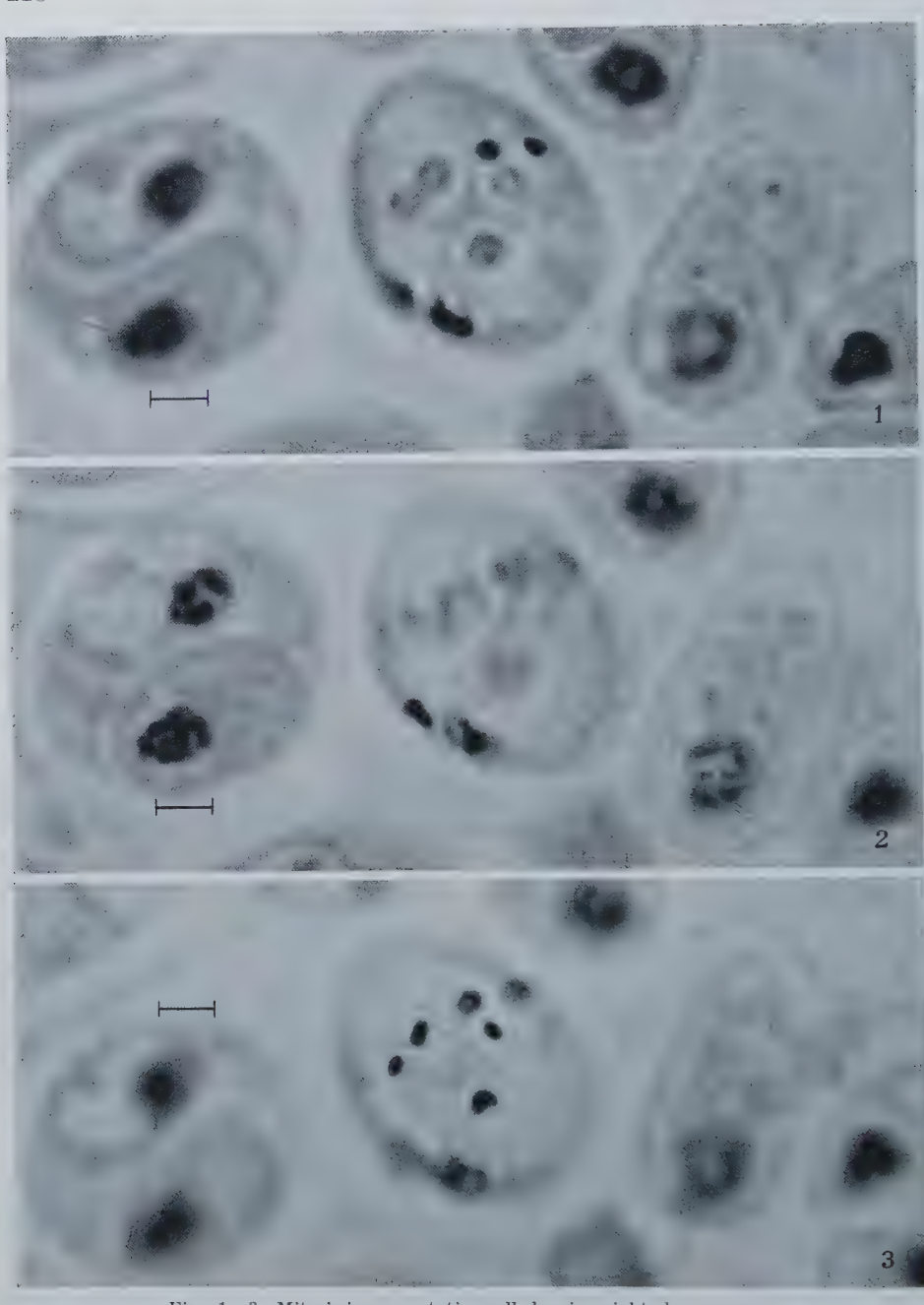
In referring to the sequence of nuclear events preceding meiosis, their beginning or zero-time is at the time of mixing gametes of opposite mating type. For the cytological events of meiosis, zero-time is the time at which mature zygotes are transferred to fresh medium and placed in the light.

Pairing begins almost immediately upon mixing gametes of opposite mating types. The pairing and subsequent fusion of cells can be seen readily in living material and the entire process often occurs in less than 5 minutes. Upon cell fusion binucleate zygotes are observed as seen in Fig. 5. The binucleate condition is retained for two and a half to three hours whereupon nuclei begin to fuse as illustrated by Fig. 6. Nuclear fusion is complete within an hour, and at the fourth and fifth hours, Figs. 7 and 8, the single zygote nucleus shows a number of spherical chromatic granules dispersed among some thread-like material. By the sixth hour, Fig. 9, chromatic material begins to condense so that by the end of seven hours the nucleus becomes dense and compact as shown in Fig. 10. A four-day old zygote is shown in Fig. 11.

Stages of meiosis are shown in the remaining figures. The first meiotic figures are seen at about the tenth hour after the mature zygotes have been transferred to fresh medium and placed in the light. Fig. 12 illustrates very early prophase at which time it is possible to observe numerous diffuse chromatic granules. By the eleventh hour, Fig. 13 these diffuse bodies can be resolved into seven to nine dense structures about 0.3 to 0.5 micra in diameter. In other instances illustrating later stages of prophase or early metaphase, as in Figs. 14 and 15, it is possible to count at least six chromosomes. The extremely small size of these chromosomes does not permit as accurate determination of chromosome number as was the case with the vegetative cells. The two divisions of meiosis are complete by about the twelfth hour, and Figs. 16 and 17 illustrate the second meiotic division and the final four cell stage, respectively.

## Discussion and Conclusions

The nuclear cycle of zygotes of *C. reinhardi* can be divided into three parts. Part one involves the initial stages of zygote formation beginning from the time of gametic pairing through gametic fusion to nuclear fusion. These events are relatively rapid, requiring three to four hours from the onset of mating until a uninucleate zygote is formed.




Figs. 1—3. Mitosis in a vegetative cell showing eight chromosomes

Part two of the cycle is zygote maturation. Very little is known regarding the cytological and biochemical changes which attend the maturation of the zygotes in this part of the cycle. It is known, however, that the first 18 to 24 hours of the zygote stage must be spent in the light whereupon zygotes complete

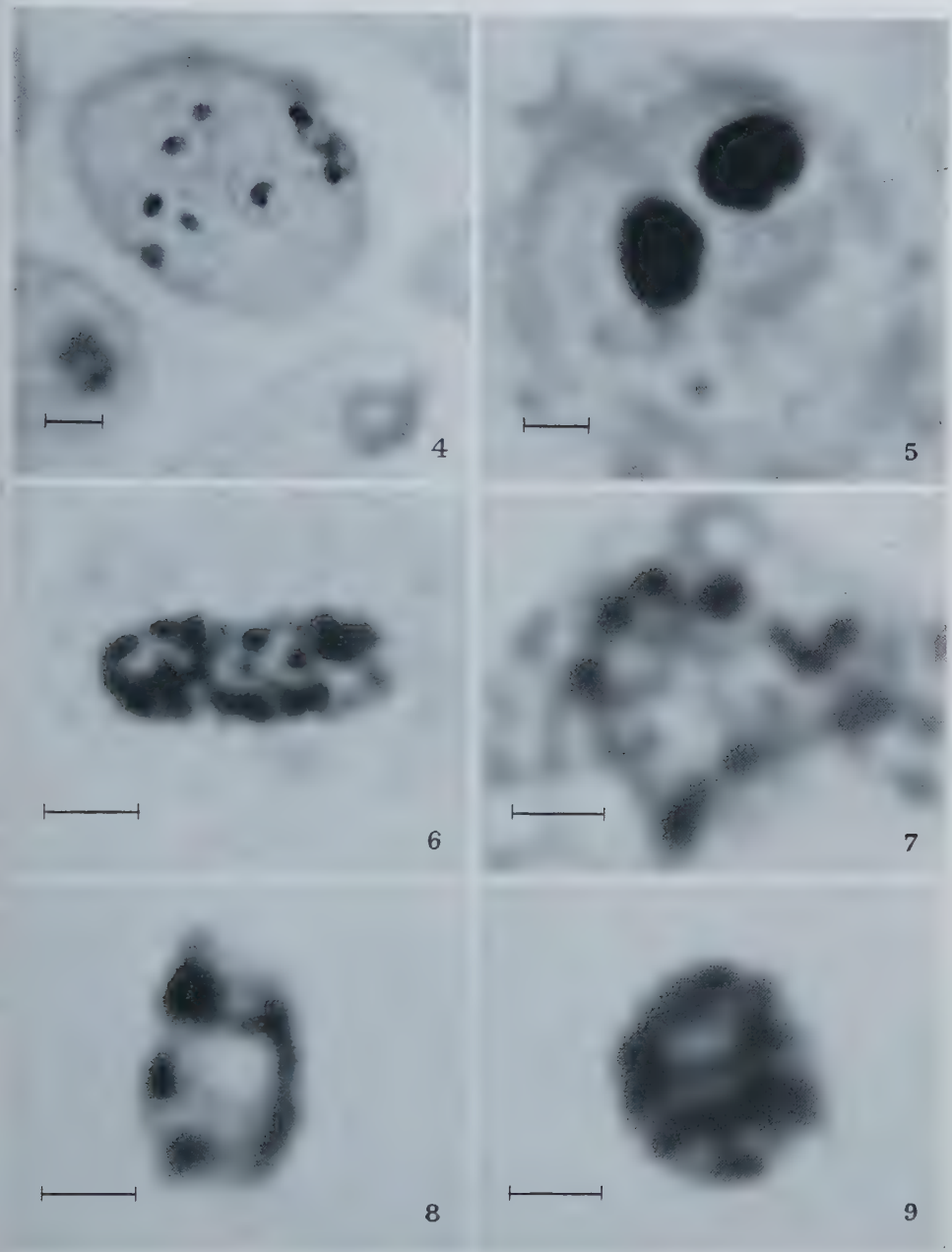



Fig. 4. Composite photograph of cell shown in Figs. 1—3

Fig. 5. Binucleate stage of zygote; 5 minutes to 3 hours after mating

Fig. 6. Nuclear fusion in zygote; 3 hours to 4 hours after mating

Figs. 7 and 8. Four and five-hour zygotes respectively showing a number of spherical chromatic granules

Fig. 9. Six-hour zygote in which chromatic material has condensed

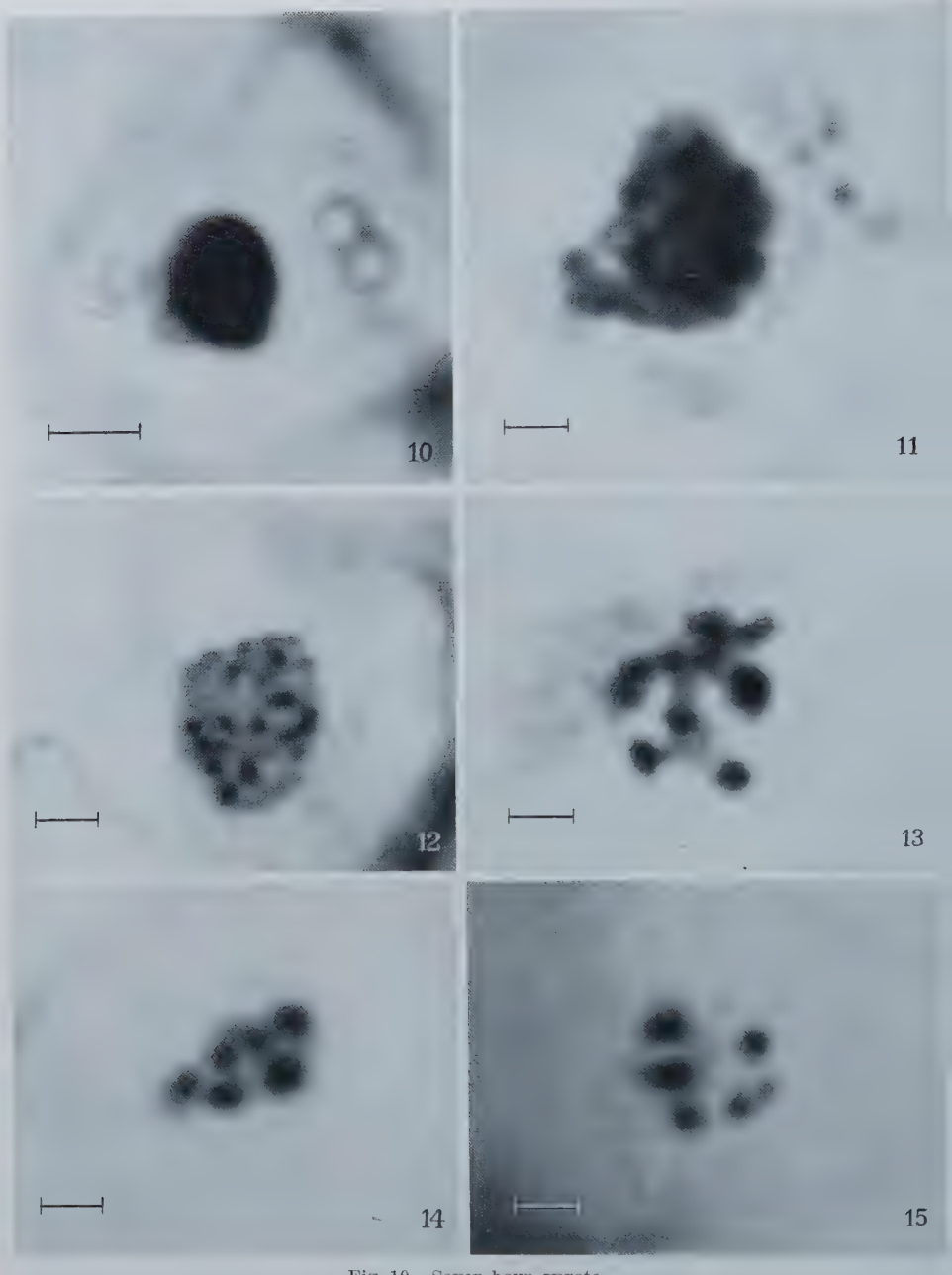



Fig. 10. Seven-hour zygote

Fig. 11. Four-day zygote

Figs. 12—15. Meiosis, early prophase to metaphase; 10 to 11 hours after mature zygotes have been transferred to fresh medium

the maturation process in the dark. Of particular interest during the maturation period are the changes in the appearance of the nucleus that occur between the fourth and sixth hours after mating. The nature of these changes is unknown.

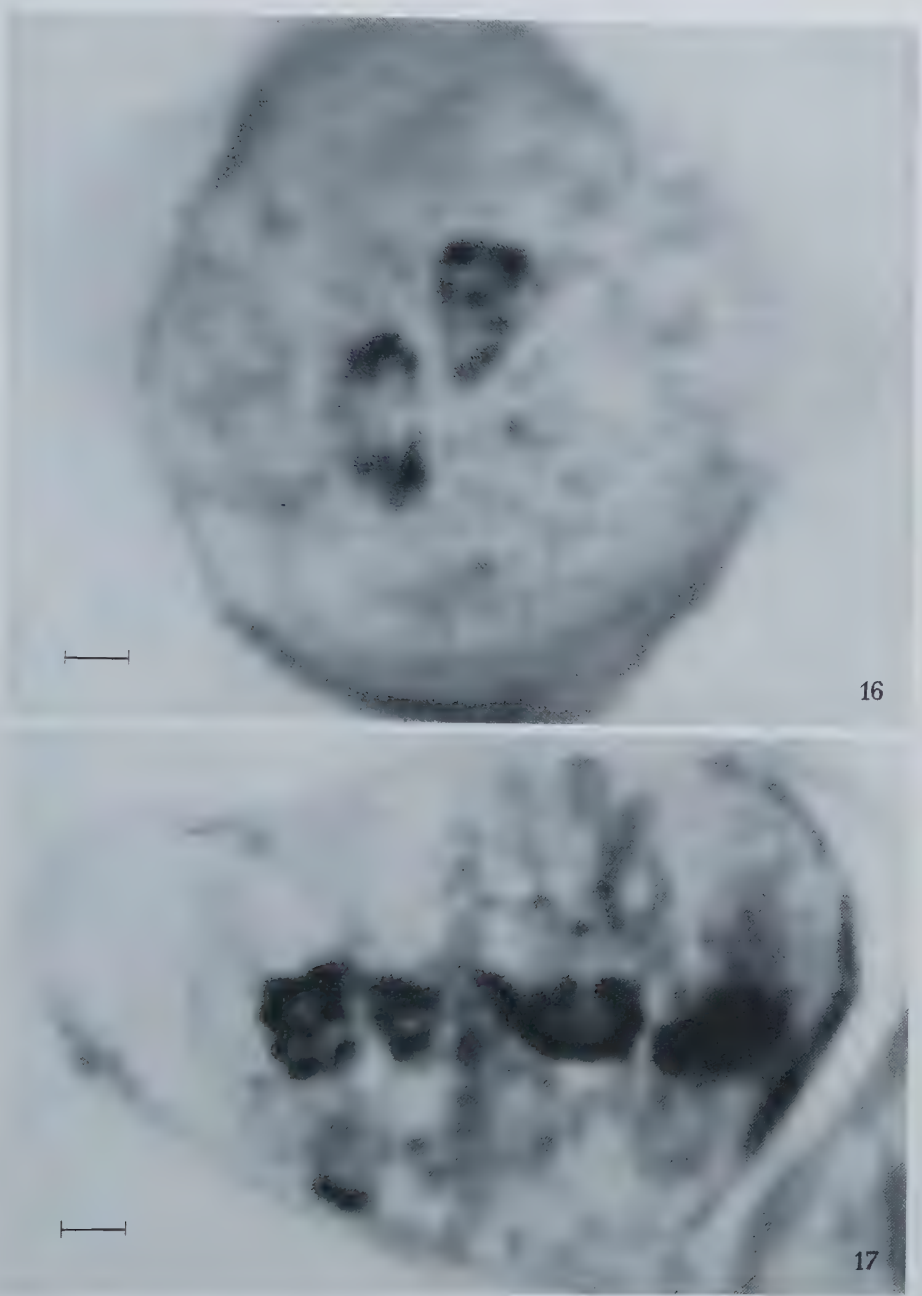



Fig. 16. Second meiotic division; 12 hours after mature zygotes have been transferred to fresh medium
Fig. 17. Tetrad; 12 hours after mature zygotes have been transferred to fresh medium

There are no apparent changes after this time, and the nucleus retains a dense, compact appearance until prophase.

Part three of the nuclear cycle is meiosis of a classical sort which is in no way unusual except perhaps for the speed with which it occurs. The process of

meiosis from the time of its onset requires about twelve hours with the readily characterized stages from prophase to the formation of a tetrad taking place between the tenth to twelfth hour.

The haploid chromosome number has been observed to be eight in vegetative cells and six to eight in zygotes. These findings are in general agreement with those of Buffaloe (1958) who ascertained a chromosome number of eight in the vegetative cells of four species of Chlamydomonas, including *C. reinhardi*.

Genetic analysis in this laboratory (unpublished) has revealed at least seven linkage groups in *C. reinhardi* and is thus compatible with the observed number of chromosomes. In addition, the genetic studies mentioned in the first part of this paper which reveal orthodox patterns of segregation, independent assortment, and linkage are supported by the cytological observations reported here.

## Literature

Buffaloe, N.: A comparative cytological study of four species of Chlamydomonas. Bull. Torrey bot. Club. **85**, 157 (1958). — De Lamater, E. D.: A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain Technol. **26**, 199 (1951). — Ebersold, W. T.: Crossing over in *Chlamydomonas reinhardi*. Amer. J. Bot. **43**, 408 (1956). — Ebersold, W. T., and R. P. Levine: A genetic analysis of linkage group I in *Chlamydomonas reinhardi*. Z. Vererb.-Lehre (in press) (1959). — Gowans, C. S.: Genetic investigations on *Chlamydomonas eugametos*. Doctoral Diss. Stanford University 1956. – Hartshorn, J. N.: Multiple mutation in *Chlamydomonas reinhardi*. Heredity **9**, 239 (1955). — Levine, R. P., and W. T. Ebersold: (1) The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas reinhardi*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 631 (1958a). — (2) Gene recombination in *Chlamydomonas reinhardi*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **23** (1958b). — Lewin, R. A.: The genetics of *Chlamydomonas moewusii*. J. Genet. **51**, 543 (1953). — Sager, R.: Inheritance in the green alga, *Chlamydomonas reinhardi*. Genetics **40**, 476 (1955).

Dr. R. P. Levine,
Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts (USA)

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 223—230 (1959)

Aus dem Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie (Abt. Lüers), Berlin-Dahlem (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Nachtsheim)

# CHROMOSOMENFRAGMENTE, MINUTES UND SICHTBARE MUTATIONEN BEI *DROSOPHILA* NACH BEHANDLUNG MIT CHINON I (BAYER G 4073)*

Von

H. J. Belitz

*(Eingegangen am 23. März 1959)*

## Einleitung

Zu den interessantesten Ergebnissen der Chemogenetik an *Drosophila melanogaster* gehören der Nachweis einer spezifischen Sensibilität der einzelnen Stadien der Keimzellentwicklung, die ihren Ausdruck in den Brutmustern findet, das Auftreten von Mosaikmutationen sowie die relativ geringe Häufigkeit großer hromrosomaler Strukturveränderungen nach Anwendung der meisten näher untersuchten chemischen Mutagene (Auerbach 1946, 1947; Auerbach und Robson 1947). Für Mutationen, die durch Triäthylenmelamin (TEM) induziert worden waren, konnten Fahmy und Fahmy (1956) eine andere Verteilung über die genetische Karte des X-Chromosoms nachweisen, als sie Spencer und Stern (1948) für strahleninduzierte Erbänderungen ermittelt haben. Dieser Effekt des TEM konnte durch einen Vergleich mit der Verteilung spontaner Letalfaktoren bestätigt werden (Belitz 1957). Eine ähnliche Abweichung von der Verteilung der spontanen Mutationen zeigten durch Chinon I (2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4) induzierte Erbänderungen des Geschlechtschromosoms (Belitz 1957). Beide Verteilungen der induzierten Mutationen sind charakterisiert durch eine relative Abnahme der Mutationshäufigkeit am linken Chromosomenende bzw. durch eine relative Zunahme der Mutationshäufigkeit im rechten Teil des Chromosoms. In der vorliegenden Untersuchung sollen im Hinblick auf diese Beobachtungen und die damit verbundenen Fragen nach Applikation des Chinon I als mutagenes Agens an Männchen ermittelt und verglichen werden: 1. die Häufigkeit chromosomaler Strukturveränderungen, 2. die Rate der geschlechtsgebundenen rezessiven sichtbaren Erbänderungen unter Berücksichtigung des Anteils der Mosaikmutationen, 3. die zeitliche Korrelation von Mutationsraten und Fertilität im Brutmuster. Als Maß für die Häufigkeit chromosomaler Strukturveränderungen wurde unter Verwendung der *attached-X*-Technik die Häufigkeit der Fragmentation des Geschlechtschromosoms und die Rate der Minutes gewählt, die sehr häufig auf kleine Defizienzen zurückzuführen sind. Außerdem berichten Fahmy und Fahmy (1955), daß sie diesen Mutationstyp nach Anwendung von TEM ziemlich häufig gefunden haben. Sie konnten darüber hinaus für Minutes ein Brutmuster ermitteln, das von dem für rezessive Letalfaktoren abweichen soll. An dem gleichen Material bestimmten wir die Rate der sichtbaren Mutationen. Die Fertilitätsschwankungen sollen besonders im Hinblick auf Ergebnisse betrachtet werden, die von einigen Autoren mit TEM erhalten wurden, weil TEM

* 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4.

und Chinon I, obwohl sie zu verschiedenen Stoffgruppen gehören, in den Äthyleniminogruppen vermutlich dasselbe mutagene Prinzip besitzen. Ein Abfall der Fertilität kann zustande kommen durch eine unspezifische (nicht genetische) Schädigung von Keimzellen oder durch Auslösung dominanter Letalfaktoren, die häufig auf Chromosomenmutationen beruhen.

## Material und Methodik

Je 20 ♂♂ von *Drosophila melanogaster*, Stamm Berlin-wild, wurden auf Filtertiegel-Fritten gesetzt und diese für die Dauer von 3 Tagen mit einer Lösung von 0,023% Chinon I (Bayer G 4073; 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4) in 5%igem Zuckerwasser beschickt. Das Mutagen wurde während dieser Zeit von den Tieren per os aufgenommen. In 2 Versuchen wurden die so behandelten ♂♂ anschließend mit *attached-X* ♀♀ gepaart. In Abständen von je 3 Tagen wurden die ♂♂ noch 9mal mit neuen virginen ♀♀ auf frische Futtergläschen gesetzt und so insgesamt 10 Bruten (Serien) gewonnen. Die ♀♀ der vorangegangenen Paarung wurden noch 2mal je 3 Tage zur weiteren Eiablage auf frische Futtergläschen umgesetzt, um ein möglichst großes Material zu erhalten. Einen gegebenenfalls entstehenden Fehler durch die längere Aufbewahrungsdauer der Spermien in den ♀♀ glaubten wir in Kauf nehmen zu können, da die zu erfassenden Mutationstypen nur in geringer Anzahl erwartet wurden. Wie die Versuchsprotokolle zeigen, läßt sich kein in dieser Richtung zu deutender Effekt erkennen, so daß auf eine detaillierte Wiedergabe in den Tabellen verzichtet werden kann. Im ersten Versuch wurden ♀♀ des Stammes *yvf.* =, im zweiten des Stammes *yvf car.* = verwendet, der sich durch eine bessere Fertilität auszeichnete. Mit diesem zweiten Stamm wurde ein entsprechender Kontrollversuch durchgeführt, in dem die ♂♂ nur mit einer 5%igen Zuckerwasserlösung behandelt wurden. Das Alter der ♂♂ betrug bei Versuchsbeginn 2—3 Tage. Alle Kulturen wurden bei einer Temperatur von $25 \pm 1^0$ C gehalten.

In den Experimenten wurden folgende Mutationen erfaßt: 1. Fragmente der behandelten X-Chromosomen, die in den $F_1$-♀♀ zur Unterdrückung eines oder mehrerer Markierungsgene des *attached-X*-Chromosoms führten; 2. unter den $F_1$-♂♂ wurden als Minutes alle Tiere registriert, die dieses Merkmal zeigten und entweder steril waren oder in ihrer Nachkommenschaft wieder Minutes lieferten; 3. rezessiv geschlechtsgebundene sichtbare Mutationen bei den $F_1$-♂♂; 4. dominant sichtbare Mutationen bei $F_1$-♀♀ und $F_1$-♂♂. Als sichtbare Mutationen wurden nur diejenigen gewertet, deren mutativer Charakter im Nachkommenschaftstest gesichert werden konnte; dagegen blieben alle sichtbaren Mutationen, die gleichzeitig zur Sterilität führten, und somatische Mosaike mit normaler Nachkommenschaft bei der Errechnung der Mutationsraten unberücksichtigt.

## Experimenteller Teil

### *1. Die spontane Mutabilität*

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse des Kontrollversuchs, der mit 40 P-♂♂ ausgeführt wurde. Unter über 12000 ausgezählten *yvf car.* = ♀♀ wurde nur ein einziges X-Chromosomenfragment gefunden. Dieses Tier entsprach dem Phänotyp $y^+ v^+ f$ *car.* Es starb, ohne Nachkommen geliefert zu haben. Drei andere ♀♀ (jeweils eins in den Serien I, II, und X) hatten normale oder etwas kürzere Borsten und lieferten in den folgenden Generationen ebensolche Töchter und normale Söhne im Verhältnis 1:1; die Fertilität dieser Tiere war nicht herabgesetzt. Sie wurden nicht als Fragmente gewertet. Die Spontanrate für das Auftreten von Fragmenten des X-Chromosoms ergab sich somit zu 0,008%. In den Tabellen sind unter den Häufigkeiten die Vertrauensgrenzen der Erwartung für ein $P$ von 0,01 nach Stevens (1942) angegeben. Die Gesamtrate der Minutes beträgt 0,12%; die Verteilung über die einzelnen Serien geht aus Tabelle 1 hervor. Drei der 40 $P$-♂♂ lieferten je 2 Minutes, nämlich in den Serien II; II und IV;

Tabelle 1. *Kontrollversuch. P-♂♂ 3 Tage lang mit 5%igem Zuckerwasser gefüttert und im Abstand von jeweils 3 Tagen mit je einem yvf car. = ♀ gepaart*

| Serie | Weibchen | Fragmente | | Männchen | Minutes | | Rezessiv sichtbare Mutationen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *n* | % | *n* | *n* | % | *n* | % |
| I | 736 | | | 861 | 1 | 0,12 | | |
| II | 1142 | | | 1376 | 4 | 0,29 | | |
| III | 1937 | | | 2225 | 6 | 0,27 | 1 | 0,04 |
| IV | 1675 | | | 2037 | 3 | 0,15 | | |
| V | 1636 | | | 2333 | 1 | 0,04 | | |
| VI | 1537 | | | 2159 | 2 | 0,09 | | |
| VII | 1235 | | | 1641 | 1 | 0,06 | | |
| VIII | 665 | 1 | 0,15 | 828 | | | | |
| IX | 873 | | | 975 | | | | |
| X | 1263 | | | 1579 | 1 | 0,06 | | |
| Summe . . . | 12699 | 1 | 0,008 | 16014 | 19 | 0,12 | 1 | 0,006 |
| Untere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,00008 | | | 0,065 | | 0,000063 |
| Obere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,052 | | | 0,199 | | 0,041 |

III und IV. Die große Häufigkeit von Minutes im Vergleich zu den rezessiv sichtbaren Mutationen läßt vermuten, daß es sich in den meisten Fällen nicht um echte Minutes, sondern um Entwicklungsstörungen handelt, die den Minute-Typ phänokopieren. Unter den 16014 ♂♂ der $F_1$ wurde nur eine sichtbare Erbänderung erhalten. Das betreffende ♂ hatte ein normales linkes und ein *garnet*-ähnlich gefärbtes rechtes Auge. Nach Paarung mit einem *yvf car.* = ♀ hatten sämtliche 46 ♂♂ *garnet*-ähnliche Augen. Die spontane Rate der geschlechtsgebundenen rezessiven sichtbaren Mutationen betrug also 0,006%. Ein weiteres ♂ (von einem anderen P-♂ in der V. Serie) besaß ebenfalls *garnet*-ähnliche Augen, ergab aber nur normale Söhne in der Nachkommenschaft und wurde nicht als Mutation gewertet. Dominant sichtbare Erbänderungen wurden nicht aufgefunden.

### *2. Mutationsversuche mit Chinon I*

In einem ersten Experiment wurden 40 mit Chinon I behandelte ♂♂ mit je einem *ywf.* = ♀ angesetzt. Da die ♀♀ dieses *attached-X*-Stammes eine geringe Fertilität hatten, wurden von der VI. Serie an jedem ♂ zwei ♀♀ gegeben. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 2a dargestellt. Insgesamt wurden unter 1900 ausgezählten $F_1$-♀♀ vier (0,21%) mit einem X-Fragment gefunden. Diese 4 Tiere waren phänotypisch: $y^+wf$; $y^+w^+f$; $y^-w^+f$ und $y^+wf^+$. Die beiden $y^+w^+f$-♀♀ zeigten außerdem eine rauhe Beschaffenheit der Augenoberfläche. Alle Fragmente traten in der Nachkommenschaft verschiedener P-♂♂ auf. Die 9 Minutes wurden von nur 2 ♂♂ erhalten, nämlich 1 von einem P-♂ in der II. Serie, alle übrigen von einem anderen ♂, so daß die 7 Minutes der Serien IX und X sicher als ein Nest (cluster) identischer Mutationen anzusehen sind. Aus diesem Grunde lassen sich hier, wie für die wenigen sichtbaren Erbänderungen und Fragmente keine Aussagen hinsichtlich eines Brutmusters ableiten. Die Ausbeute an rezessiv sichtbaren Erbänderungen war kaum größer als die an Fragmenten. Die beiden Mutationen der Serien IX und X waren von einem ♂ geliefert worden und erwiesen sich als allel. Mosaike wurden unter den sichtbaren Mutationen dieses Versuchs nicht aufgefunden. Die beiden dominant sichtbaren Mutationen

Tabelle 2a. *1. Chinon-Versuch. P-♂♂ 3 Tage lang mit einer Lösung von 0,023% Chinon I in 5%igem Zuckerwasser gefüttert und im Abstand von jeweils 3 Tagen zur Serie I—V mit je 1, zur Serie VI—X mit je 2 ywf.* = ♀♀ *gepaart*

| Serie | Weibchen | Fragmente | | Männchen | Minutes | | Rezessiv sichtbare Mutationen | | Dominant sichtbare Mutationen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *n* | % | *n* | *n* | % | *n* | % | *n* | % |
| I | 290 | | | 278 | | | 1 | 0,36 | | |
| II | 473 | 3 | 0,63 | 447 | 1 | 0,22 | 1 | 0,22 | 1 | 0,11 |
| III | 111 | | | 74 | 1 | 1,35 | | | | |
| IV | 100 | | | 90 | | | | | 1 | 0,53 |
| V | 182 | | | 169 | | | 1 | 0,59 | | |
| VI | 321 | 1 | 0,31 | 320 | | | | | | |
| VII | 191 | | | 196 | | | | | | |
| VIII | 67 | | | 100 | | | | | | |
| IX | 87 | | | 103 | 6 | 5,83 | 1 | 0,97 | | |
| X | 78 | | | 119 | 1 | 0,84 | 1 | 0,84 | | |
| Summe . . . | 1900 | 4 | 0,21 | 1896 | 9 | 0,48 | 5 | 0,26 | 2 | 0,05 |
| Untere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,043 | | | 0,19 | | 0,067 | | 0,0079 |
| Obere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,61 | | | 0,99 | | 0,69 | | 0,44 |

Tabelle 2b. *2. Chinon-Versuch. P-♂♂ wie in Versuch 1 behandelt, aber mit je 1 yvf car.* = ♀ *gepaart*

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 2075 | 3 | 0,14 | 1972 | 5 | 0,25 | 12 | 0,61 | 2 | 0,05 |
| II | 1186 | 1 | 0,08 | 1143 | 4 | 0,35 | 14 | 1,23 | 2 | 0,09 |
| III | 466 | 2 | 0,43 | 468 | 1 | 0,21 | 4 | 0,85 | | |
| IV | 422 | | | 431 | 3 | 0,70 | | | | |
| V | 1294 | | | 1667 | 3 | 0,18 | 1 | 0,06 | | |
| VI | 1509 | | | 1758 | 1 | 0,06 | 1 | 0,06 | | |
| VII | 1172 | | | 1543 | 1 | 0,06 | 1 | 0,06 | | |
| VIII | 1185 | 1 | 0,08 | 1308 | 3 | 0,23 | 1 | 0,08 | | |
| IX | 848 | | | 955 | | | 1 | 0,10 | | |
| X | 613 | | | 721 | | | | | | |
| Summe . . . | 10770 | 7 | 0,06 | 11966 | 21 | 0,18 | 35 | 0,29 | 4 | 0,02 |
| Untere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,022 | | | 0,099 | | 0,19 | | 0,0069 |
| Obere Grenze ($P = 0{,}01$) | | | 0,15 | | | 0,288 | | 0,43 | | 0,097 |

zeigten eine Reduktion der IV. und V. Flügelader vor dem Flügelrand. Einen ähnlichen Effekt beobachteten wir bei einer der rezessiv geschlechtsgebundenen Erbänderungen. Das Merkmal Aderreduktion, das im 2. Chinon-Versuch ebenfalls einige Male beobachtet wurde, besaß fast immer eine sehr geringe Penetranz.

Die Ergebnisse des 2. Chinon-Versuchs, in dem 58 P-♂♂ angesetzt wurden, enthält Tabelle 2b. Aus den 7 aufgefundenen hyperploiden ♀♀ errechnet sich die Fragmentationsrate zu 0,06%. Im einzelnen zeigten diese Weibchen folgenden Phänotyp: 4mal $y^+vf\ car.$; je einmal $y^+vf\ car^+$; $y^+vf^+\ car^+$; $yvf\ car^+$. Die Fragmente verteilen sich nicht gleichmäßig über die 10 Serien. Faßt man wegen der Seltenheit der Fragmente die Ergebnisse der Tabellen 2a und b zusammen, so ergibt sich folgendes Brutmuster: Serie I = 0,13%; Serie II = 0,24%; Serie III = 0,35%; darauf erfolgt ein steiler Abfall und nur noch in den Serien VI (0,05%) und VIII (0,08%) tritt je ein Fragment auf. Ob der Anstieg in den ersten 3 Serien reell ist, läßt sich nicht angeben.

Die Rate der Minutes ist nur schwach erhöht und gegenüber den Kontrollen statistisch nicht zu sichern. Das wird besonders deutlich, wenn man gleich-

zeitig die Höhe der Mutationsraten der rezessiv sichtbaren Erbänderungen in den Tabellen 1 und 2b betrachtet. Da sicherlich auch in den Chinon-Versuchen ein Teil der Minutes wie in dem Kontrollversuch eher auf einer Entwicklungsstörung beruht als auf einem Mutationsereignis, läßt sich abschätzen, daß sie vermutlich keinen allzu großen Anteil an dem gesamten Mutationsgeschehen haben.

Die 35 rezessiv geschlechtsgebundenen sichtbaren Mutationen des 2. Versuchs lassen ein ähnliches Brutmuster wie die Fragmente erkennen. Dabei liegt das Maximum an Mutationen in der II. Serie, ein Befund, der nicht ganz übereinstimmt mit den Ergebnissen für rezessiv geschlechtsgebundene Letalfaktoren, die von H. Lüers (1956) mit dem gleichen Mutagen und entsprechender Behandlung der P-♂♂ im Muller-5-Test mit folgenden Raten erhalten wurden: Serie I = 10,8%; II = 8,6%; III = 11,6%. Da jedoch geringfügige Veränderungen der Versuchsbedingungen eine höhere oder niedrigere Mutationsrate in eine benachbarte Serie verschieben können, möchten wir dieser Differenz keine besondere Bedeutung beimessen. Nester identischer Mutationen sind unter den Erbänderungen dieses Versuchs nicht aufgefunden worden.

Bei der Bearbeitung der sichtbaren Mutationen wurde den Mosaikmutationen besondere Beachtung geschenkt. Unter den 12 bzw. 14 rezessiv sichtbaren Erbänderungen der I. bzw. II. Serie befanden sich je 8, die in allen späteren Generationen eine vollständige Penetranz und gute Expressivität zeigten. Von ihnen waren 2 in der ersten und 6 in der II. Serie als Mosaike aufgetreten, und zwar die beiden Mutationen der ersten Serie als somatische Mosaike, deren männliche Nachkommen nach Kreuzung mit *attached-X*-♀♀ ausschließlich das mutierte Merkmal zeigten. Die 6 Mosaike der II. Serie waren sämtlich Gonadenmosaike, davon 4 gleichzeitig somatische. Besonders erwähnenswert erscheint uns ein *white*-Mosaik: das $F_1$-♂ hatte ein normales und ein *white-mottled*-Auge. Die Kreuzung dieses Tieres mit einem virginen *yvf car.* = ♀ lieferte neben 64 + ♂♂ nur 3 *white*-♂♂, von denen ausgehend ein reiner Stamm aufgebaut werden konnte. Es liegt nahe, daß bei derartigen Zahlenverhältnissen unter Umständen Mosaikmutanten übersehen werden können, wenn die Nachkommenschaften zu klein ausfallen. Eins der zur Prüfung wegen eines Flügeldefektes angesetzten $F_1$-♂ aus der VI. Serie erwies sich als gonosomes Mosaik: es lieferte nur 34 ♀♀ und kein ♂ als Nachkommen nach Paarung mit einem *attached-X*-♀. Es war demnach gonadisch letal. Aus den obigen Zahlenangaben ergibt sich die Rate der Mosaikmutationen, bezogen auf die Anzahl aller rezessiv sichtbaren Erbänderungen mit guter Expressivität und 100%iger Penetranz zu 50%. Unter denjenigen zur Prüfung angesetzten $F_1$-♂♂ mit Mosaikcharakter, die entweder gar keine Nachkommen oder nur normale ♂♂ lieferten, befanden sich zweifellos noch weitere genetische Mosaike. Bei der Prüfung aller Gonadenmosaike lag in der nächsten Generation der Anteil der ♂♂ mit dem mutierten Charakter stets unter 50%.

Schließlich sei noch auf eine Anzahl $F_1$-♂♂ hingewiesen, die in den Tabellen nicht als Mutanten enthalten sind, da sie sich als steril erwiesen bzw. ohne Nachkommenschaft starben oder eine normale Nachkommenschaft ergaben. Dabei handelt es sich um Tiere, bei denen an einem oder beiden Flügeln die V. Ader vor Erreichen des Flügelrandes endete. Sie traten im Kontrollversuch insgesamt 4mal auf (Serie III, III, VII, VIII) mit einer Häufigkeit von 0,02%, im 1. Chinon-Versuch 2mal (Serie V und X) mit einer Häufigkeit von 0,11% und im 2. Chinon-

Versuch insgesamt 16mal mit einer Rate von 0,13% mit folgender Verteilung über die Serien: I (6), II (5), III (1), IV (1), VI (2), VIII (1). — Der 2. Männchen-Typ zeigte mehr oder weniger stark reduzierte Flügel und glich der Mutante *rudimentary*. Er wurde in dem Kontrollversuch und dem 1. Chinon-Versuch nicht, dagegen im 2. Chinon-Versuch 4mal in Serie I und einmal in Serie II gefunden. Die Verteilung beider Typen über die Serien entspricht dem für sichtbare Mutationen ermittelten Brutmuster; ob es sich um Mutationen handelt, läßt sich nicht entscheiden.

In beiden Mutationsversuchen mit Chinon I zeigt die Anzahl der Nachkommen in den Serien III und IV ein stark ausgeprägtes Minimum. Das Maximum der Mutationsraten sowohl der Fragmente als auch der rezessiv sichtbaren Mutationen liegt stets vor dem Minimum der Fertilitätskurven.

## Diskussion

Die vorliegenden Mutationsversuche sollten Auskunft geben über die Häufigkeit von Fragmenten des X-Chromosoms, das Auftreten von Minutes, den Anteil von Mosaiken unter den sichtbaren Mutationen und den Einfluß des Mutagens auf die Fertilität der behandelten ♂♂. Die Rate der X-Chromosomenfragmente ist in beiden Mutationsversuchen gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht. Die aufgefundenen Fragmente verteilen sich nicht gleichmäßig über die 10 Serien der Versuche, sondern treten in den Serien I—III gehäuft auf. Das sich daraus ergebende Brutmuster stimmt mit dem für rezessive Letalfaktoren des X-Chromosoms von H. Lüers (1956 und unveröff.) ermittelten darin überein, daß die Mutationsraten nach der III. Serie stark abfallen, wenn die identischen Mutationen der Nester auf 1 korrigiert werden. Auf die Differenzen zwischen den ersten 3 Serien möchten wir kein Gewicht legen; zur Ermittlung derartiger Feinheiten sind besondere Untersuchungsmethoden erforderlich (Auerbach 1957).

Die Ausbeute an Minutes blieb in den Chinon-Versuchen hinter unseren Erwartungen zurück. In dem ersten Versuch (Tabelle 2a) kommt die hohe Rate von 5,8% in der IX. Serie durch ein Nest zustande, das für die Induktion von Minutes durch das Mutagen spricht. Vergleicht man aber insgesamt die Raten der sichtbaren Mutationen und der Minutes, so wird deutlich, daß letztere keinen allzu großen Anteil an der Gesamtmutabilität haben. Es bleibt daher zweifelhaft, ob überhaupt kleine Defizienzen wesentlich am Mutationsgeschehen nach Einwirkung von Chinon I beteiligt sind und die von der Verteilung spontaner Erbänderungen abweichende Verteilung durch Chinon I induzierter Mutationen über die genetische Karte des X-Chromosoms (Belitz 1957) wesentlich mitbestimmen. In dieser Untersuchung war die Häufigkeit großer chromosomaler Strukturveränderungen unter den Letalfaktoren mit nur 10,6 bzw. 14,9% bestimmt worden. Keinesfalls können wir aus der vorliegenden Arbeit für das Chinon I den von Fahmy und Fahmy (1955) für das TEM erhobenen Befund unterschiedlicher Brutmuster für letale Mutationen einerseits (die mit dem Brutmuster für sichtbare Erbänderung übereinstimmen) und Minutes andererseits bestätigen.

Das gleiche Brutmuster wie die Fragmente zeigen auch die erhaltenen rezessiv geschlechtsgebundenen sichtbaren Mutationen. Auf den erhöhten Anteil von

Mosaikmutationen am Mutationsgeschehen nach Anwendung chemischer Mutagene ist wiederholt hingewiesen worden. So fanden AUERBACH (1947) in Versuchen mit Senfgas und VOGT (1950) nach Anwendung von Äthylurethan unter den geprüften „semiletalen" Erbänderungen etwa 50% Mosaikmutationen, während der Rest sich als echte semiletale Mutationen erwies. Als Anteil von Mosaikmutationen an allen sichtbaren Erbänderungen geben BIRD und FAHMY (1953) für Diepoxybutan 43% an, ein Wert, der etwas niedriger liegt, als er für Senfgas von AUERBACH (1946) gefunden wurde. Der von uns mit 50% ermittelte Wert für Chinon I (Versuch 2) liegt in der gleichen Größenordnung. Natürlich ist bei den kleinen Zahlen die Fehlerbreite beträchtlich.

Bei den Chinon-Versuchen fällt der Abfall der Fertilität in der III. und IV. Serie auf. Das Fertilitätsminimum liegt in beiden Versuchen hinter dem Maximum der Mutationsraten für Fragmente und rezessiv sichtbare Mutationen. Wenn sich im einzelnen auch keine exakten Aussagen darüber machen lassen, in welchem Stadium der Keimzellenentwicklung sich die Spermien zur Zeit der Behandlung befanden, so können doch einige ausschließende Feststellungen getroffen werden, besonders aus dem größeren Material des 2. Chinon-Versuchs. Die gleichmäßig niedrige Mutationsrate der sichtbaren Erbänderungen in den höheren Serien wurde zweifellos von Spermien geliefert, die zur Behandlungszeit noch im Spermatogonienstadium waren. Die relativ hohen Mutationsraten in der I. und II. Serie stammen sicher von Spermien, die als reife Spermien oder als postmeiotische Stadien behandelt worden sind. Bezogen auf die Spermiogenese wäre das Fertilitätsminimum demnach zwischen den Spermatogonien und den späten Spermatiden zu lokalisieren, es läge außerdem vor dem Maximum der Mutabilität. In den sehr sorgfältigen Untersuchungen von AUERBACH (1954) wurde für röntgen-induzierte Mutationen ein Maximum ermittelt, das zeitlich vor den Bruten mit niedriger Fertilität bzw. exzessiver Sterilität liegt. Für Chinon I fand H. LÜERS (1956, Versuch 2) in der III. Serie ebenfalls einen Fertilitätsabfall bei gleichzeitig hoher Mutationsrate. Für das Diepoxybutan gaben BIRD und FAHMY (1953) für die ersten 9 Tage nach der Behandlung einen parallelen Verlauf der Kurven für die Rate der geschlechtsgebundenen rezessiven Letalfaktoren und die Abnahme der Fertilität an, während am 12. Tag dem Minimum der Fertilität ein Minimum der Mutationsrate entspricht. In den Untersuchungen von H. LÜERS (1953) mit dem TEM geht mit der Abnahme der Fertilität eine geringe Senkung der Mutationsrate einher, die mit Zunahme der Fertilität von der V. Serie an keinen stärkeren Anstieg mehr zeigt. Nach Anwendung der erwähnten Mutagene, einschließlich des Chinon I, liegen die Serien mit den höchsten Mutationsraten entweder vor den Serien mit der Fertilitätsverminderung oder fallen mit ihnen zusammen. Niemals geht dagegen bei diesen Mutagenen die Fertilitätsverminderung einem Anstieg der Mutabilität voraus, wie man es gelegentlich aus statistischen Gründen erwarten sollte, wenn beide Effekte ausschließlich auf die gleiche Ursache zurückgeführt werden könnten. Die Fertilitätsminderung nach Behandlung der P-♂♂ mit Chinon I scheint uns wenigstens zum Teil auf einer unspezifischen Schädigung der Keimzellen während der Spermiogenese zu beruhen und keinesfalls allein auf der Induktion dominanter Letalfaktoren, wenn man für diese nicht ein besonderes Brutmuster postulieren will.

## Zusammenfassung

Durch perorale Behandlung von *Drosophila melanogaster*-♂♂ mit einer 0,023%igen Lösung von Chinon I (Bayer G 4073; 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4) wurden in *attached-X*-Versuchen folgende Ergebnisse gewonnen:

Die Häufigkeit der Fragmentation des X-Chromosoms ist gegenüber den Kontrollen deutlich, die der rezessiv geschlechtsgebundenen sichtbaren Mutationen stark erhöht. Die geringe Zunahme der Minutes ist nicht signifikant.

Aus der Verteilung der Fragmente und der sichtbaren Erbänderungen über die insgesamt 10 Serien der Versuche ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit der späteren Stadien der Spermiogenese im Vergleich zu den jüngeren (Spermatogonien).

Ein deutlicher Fertilitätsabfall in den Serien III und IV sowie die relativ hohen Mutationsraten in den Serien I—III lassen vermuten, daß der beobachtete Fertilitätsabfall zum Teil auf einer unspezifischen Schädigung der männlichen Keimzellen im Bereich später Spermatogonien bis später Spermatiden beruht und nicht ausschließlich auf der Auslösung dominanter Letalfaktoren.

Unter den sichtbaren Erbänderungen mit guter Expressivität und 100%iger Penetranz ist die Hälfte als Mosaik aufgetreten.


## Literatur


Auerbach, C.: Chemically induced mosaicism in *Drosophila melanogaster*. Proc. roy. Soc. Edinb. B **62**, 211—222 (1946). — The induction by mustard gas of chromosomal instabilities in *Drosophila melanogaster*. Proc. roy. Soc. Edinb. B **62**, 307—320 (1947). — Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of X-rays. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 113—125 (1954). — The study of chemical mutagens by brood pattern analysis and by the scoring of ratios between visible and lethal mutations. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 619—625 (1957). — Auerbach, C., and J. M. Robson: The production of mutations by chemical substances. Proc. roy. Soc. Edinb. B **62**, 271—283 (1947). — Belitz, H. J.: Vergleichende Untersuchung der Verteilung spontaner und durch Chinon I (Bayer G 4073) induzierter Mutationen über die genetische Karte des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 434—442 (1957). — Bird, M. J., and O. G. Fahmy: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. I. 1:2, 3:4-diepoxybutane. Proc. roy. Soc. Edinb. B **140**, 556—578 (1953). — Fahmy, O. G., and M. J. Fahmy: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. IV. The cell stage during spermatogenesis and the induction of intra- and inter-genic mutations by 2:4:6-tri(ethyleneimono)-1:3:5-triazine. J. Genet. **53**, 563—584 (1955). — V. Differential genetic response to the alkylating mutagens and X-radiation. J. Genet. **54**, 146—164 (1956). — Lüers, H.: Untersuchungen über die Mutagenität des Triäthylenmelamin (TEM) an *Drosophila melanogaster*. Arch. Geschwulstforsch. **6**, 77—83 (1953). — Chinon I und Sanamycin im Mutationsversuch. Naturwiss. **43**, 206 (1956). — Spencer, W. P., and C. Stern: Experiments to test the validity of the linear r-dose/mutation frequency relation in *Drosophila* at low dosage. Genetics **33**, 43—74 (1948). — Stevens, W. L.: Accuracy of mutation rates. J. Genet. **43**, 301—307 (1942). — Vogt, M.: Ergänzende Befunde zur mutagenen Wirkung der Urethane (Carbaminsäureester) bei *Drosophila*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 341—346 (1950).



Dr. H. J. Belitz, Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie, Berlin-Dahlem, Ehrenbergstr. 26/28

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 231—243 (1959)

Aus dem Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität Berlin, Berlin-Dahlem

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER INTERALLELE WECHSELWIRKUNGEN

## II. „SUPERDOMINANZ" BEI *SILENA ARMERIA* L.*

Von

W. Seyffert

Mit 2 Textabbildungen

*(Eingegangen am 2. März 1959)*

### I. Einleitung

Für das Phänomen der Heterosis gibt es im wesentlichen 2 allgemein bekannte Erklärungsmöglichkeiten: die sog. „Dominanzhypothese", die auf der kombinanten bzw. komplementären Genwirkung dominanter Allele verschiedener Loci beruht, und die „Heterozygotiehypothese", die die Heterozygotie per se an einem oder mehreren Loci für die Mehrleistung der Bastarde verantwortlich macht. Der „Idealfall" der Heterozygotiehypothese, die Superdominanz oder monogene Heterosis, ist von besonderem Interesse, da man hier am ehesten einen Einblick in den Wirkungsmechanismus der Gene, die zur Heterosis Anlaß geben, erhoffen kann. Emerson (1948) sieht aufgrund seiner Versuchsergebnisse an *Neurospora* die mögliche Ursache für die Mehrleistung der Heterozygoten darin, daß mit einfacher Dosis eines Gens das Wirkungsoptimum bereits erreicht ist. Andererseits sprechen die Versuchsergebnisse verschiedener Autoren (vgl. z. B. Crow 1952) mehr für die Annahme einer komplementären Allelwirkung, d. h. für eine definierbare Wirkung *beider* Allele.

Untersuchungen an diploiden Organismen haben mitunter den Nachteil, daß eindeutige Entscheidungen, ob ein Wirkungsoptimum überschritten wird oder ob eine komplementäre Allelwirkung vorliegt, nicht ohne weiteres möglich sind. In dieser Hinsicht erscheinen Autopolyploide, bei denen der Gendosiseffekt ohne Mühe untersucht werden kann, als viel besser geeignet. So haben Untersuchungen an experimentell hergestellten tetraploiden *Arabidopsis thaliana* gezeigt, daß die hier vorliegende Superdominanz offenbar nicht als Folge einer kombinanten Allelwirkung, sondern vielmehr durch ein Wirkungsoptimum im $C_3c_1$-Genotypus erklärt werden kann (Wricke 1955), eine Aussage, die an diploiden Individuen nicht erhalten werden konnte.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Seyffert 1957) war die Dosiswirkung eines unvollständig dominanten Faktors bei *Antirrhinum majus* mit dem Ergebnis untersucht worden, daß die unvollständige Dominanz durch die *selbständige* Wirkung der Allele zu erklären ist. Aus der Umkehrung dieses Prinzips wäre dann zu folgern, daß die Superdominanz möglicherweise durch die *unselbständige* Allelwirkung zu charakterisieren ist. Im folgenden wird ein schon von Correns (1912) studierter Fall von „Superdominanz" bei *Silene armeria*, der von ihm durch absolute Koppelung erklärt wurde, unter diesem Gesichtspunkt erneut untersucht und beschrieben.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

## II. Material

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an der Caryophyllacee *Silene armeria* L. ($2n = 24$) durchgeführt. Da die Vererbung eines Locus, der die stärkere Rotfärbung der Blüten bei Heterozygoten *(rubra)* gegenüber beiden Homozygoten *(albida* und *rosea)* bedingt, auch bei Autotetraploiden untersucht werden sollte, wurden solche Pflanzen durch Einquellen von $F_1$-Saatgut aus der Kreuzung der diploiden *albida* × *rosea* in 0,1 und 0,05% wäßriger Colchizinlösung hergestellt. Der Behandlungserfolg wurde durch Messung der Pollenkorngröße und durch zytologische Untersuchung der Wurzelspitzenmitosen kontrolliert.

Eindeutig als tetraploid erkannte Pflanzen wurden geselbstet und die $C_1$-Nachkommen in einem Vorversuch im Gewächshaus angezogen.

Die $C_1$ zeigte eine Aufspaltung im Verhältnis von 1 *albida*:34 *rubra*:1 *rosea*. Die 3 verschiedenen tetraploiden Heterozygoten sind alle rot gefärbt, während die Homozygoten den entsprechenden diploiden in ihrer Farbausprägung phänoptisch gleichen, d. h. also weißliche bzw. rosa Blütenblätter besitzen.

Zwischen den 3 heterozygot roten Typen ist eine eindeutige Unterscheidung mit dem bloßen Auge kaum möglich, da die alters- und auch umweltbedingte Variabilität der Blütenfarbe innerhalb der einzelnen Pflanze schon so beträchtlich ist, daß eine zuverlässige Zuordnung der Phänotypen zu bestimmten Helligkeitsklassen schwierig ist. Als Ersatz für die visuelle Beurteilung wurde daher die kolorimetrische Messung der Farbintensität der Blüten gewählt, wobei besonderes Augenmerk auf die Auswahl möglichst gleichaltriger Blüten gerichtet wurde.

Der Hauptversuch wurde aus Platzgründen im Freiland durchgeführt. Hierzu wurde von verschiedenen roten Pflanzen der $C_1$-Generation Selbstungssaatgut geerntet und nachkommenschaftsweise angebaut. Da sich die roten Phänotypen aus 3 verschiedenen Heterozygoten zusammensetzten, waren in diesen Nachkommenschaften die folgenden unterschiedlichen Aufspaltungen zu erwarten:

| Elter *(rubra)* | Nachkommen | | |
|---|---|---|---|
| | *albida* | *rubra* | *rosea* |
| Simplex . . . . . | 1 | 3 | — |
| Duplex . . . . . | 1 | 34 | 1 |
| Triplex . . . . . | — | 3 | 1 |

Diese Spaltungen sind auch innerhalb der zufälligen Abweichungen vom angegebenen Idealverhältnis erhalten worden.

## III. Methoden

### *1. Extraktion und Kolorimetrie*

Im Vorversuch wurde das Anthocyan aus je 3 Blüten, die sich etwa im gleichen Entwicklungsstadium befanden, mit je 15 cm³ n/10 HCl nach Zerreiben in der Reibschale extrahiert. Die Extrakte wurden filtriert und im „Universalkolorimeter nach Dr. B. Lange, Berlin" unter Verwendung eines Grünfilters VG 9 mit einer Maximaldurchlässigkeit von 409—546 m$\mu$ in Verbindung mit einem Multiflexgalvanometer gemessen. Hierbei wurde beobachtet, daß die Farbintensität der einzelnen Pflanzen, vermutlich durch Alters-, Turgeszenz- und Gewichtsunterschiede der Blüten bedingt, noch zu stark variierte, so daß eine Zuordnung zu einer bestimmten Intensitätsstufe auch jetzt noch nicht möglich war. Außerdem war die Zahl der untersuchten Pflanzen zu gering, um eine an anderer Stelle beschriebene Aufteilung einer a priori zu erwartenden mehrgipfligen Häufigkeitsverteilung der Meßwerte vornehmen zu können.

Im Hauptversuch wurde daher die Methodik etwas abgeändert. Es wurden nunmehr nicht nur 3, sondern 5 möglichst gleichaltrige Blüten von einer sehr viel größeren Anzahl von Pflanzen entnommen. Diese Blüten wurden unmittelbar nach dem Abschneiden in Reagensgläser mit Wasser gestellt und bis zur Aufbereitung etwa 1 Std darin belassen. In der Annahme, daß dann alle Blüten gleich turgeszent waren, wurden die Blütenblätter von

einer Person abgeschnitten und sofort gewogen, von einer zweiten unmittelbar anschließend unter gleichmäßigen Bedingungen extrahiert, von einer dritten filtriert und wie bereits oben beschrieben kolorimetriert. Durch diese „Fließbandarbeit" sollten Versuchsfehler, die durch ungleichmäßige Behandlung der Blüten entstehen können, möglichst ausgeschaltet werden. Die Absorptionsmeßwerte wurden mittels einer Eichkurve auf die relative Konzentration einer Verdünnungsreihe bezogen, um die nichtlineare Beziehung zwischen Absorption und Konzentration auszugleichen. Die so korrigierten Meßwerte wurden außerdem mit Hilfe des aufgrund einer Covarianzanalyse berechneten und auf signifikante Abweichung von Null geprüften Regressionskoeffizienten auf das durchschnittliche Gewicht der Blüten bezogen, um auch den Einfluß des unterschiedlichen Blütengewichtes auf den Meßwert zu eliminieren.

### *2. Kurvenaufteilung*

Da die Methode der Kurvenzerlegung nur wenig bekannt ist, soll sie im folgenden ausführlicher beschrieben werden. Mehrgipflige Häufigkeitsverteilungen sind charakteristisch für sog. Mischkollektive, die immer dann erhalten werden, wenn die Verteilungskurven verschiedener Einzelkollektive mehr oder weniger ineinander übergehen und wenn die Zuordnung des einzelnen Meßwertes zu einem bestimmten Kollektiv anhand anderer Kriterien nicht möglich ist. In der Regel besteht in solchen Fällen der Wunsch oder die Notwendigkeit, die Einzelkollektive möglichst eindeutig zu charakterisieren, was eine Aufteilung der Mischkollektive erforderlich macht.

Mathematisch ist eine solche Kurvenaufteilung sehr schwierig, da schon im einfachsten Fall — bei Annahme zweier Teilkollektive — eine Gleichung mit 6 Unbekannten, den Parametern $N_1, N_2, \mu_1, \mu_2, \sigma_1$ und $\sigma_2$, zu lösen wäre. Es gibt jedoch in der Großzahlforschung Methoden, die anhand eines graphischen Trennungsverfahrens eine verhältnismäßig exakte Aufteilung von Mischkollektiven ermöglichen (Daeves und Beckel 1948).

Voraussetzung für die Anwendbarkeit derartiger Methoden ist, daß die Einzelkollektive der Normalverteilung folgen, eine Voraussetzung, die während der Durchführung der Kurvenaufteilung ohne Mühe überprüft werden kann. Die graphische Auftrennung wird auf sog. Wahrscheinlichkeitspapier (Schleicher & Schüll, Nr. 298½) mit metrisch geteilter Abszisse und nach dem Gaußschen Integral geteilter Ordinate vorgenommen, auf dem die Einzel- und Summenhäufigkeitsprozente der in Klassen eingeteilten Mischkollektive aufgetragen werden. Summenhäufigkeitsprozente von Normalverteilungen erscheinen in diesem Papier als lineare Funktionen, deren Schnittpunkt mit der 50%-Linie den Mittelwert $\bar{x}$, deren Neigung die Standardabweichung $\sigma$ charakterisiert. Verteilungen, die anderen Gesetzmäßigkeiten folgen, sind nichtlinear. Die Einzelhäufigkeitsprozente erscheinen als hyperbelartige Kurven mit nahezu geraden Schenkeln. Mischverteilungen sind am charakteristischen Verlauf der Einzel- und Summenhäufigkeitsprozentlinien zu erkennen, der in vielen Fällen schon Anhaltspunkte für die Eigentümlichkeiten der Teilkollektive ergibt. Die graphische Aufteilung wird nun so vorgenommen, daß zunächst der mutmaßliche Schnittpunkt der Einzelkollektive geschätzt wird. Er liegt in der Regel in der Nähe der Klasse, die innerhalb der Gesamtverteilung die geringste Einzelhäufigkeitsprozentzahl zwischen benachbarten Klassen mit höheren Werten hat, d. h. an der Stelle der stärksten Einbuchtung zwischen den Gipfeln einer Gesamtverteilung (vgl. Abb. 1 und 2). Der angenommene Schnittpunkt wird parallel zur Abszisse auf einen der beiden Schenkel der Gesamtverteilung projiziert, die so erhaltene Linie wird halbiert und in diesem Punkt das Lot auf die Abszisse gefällt. Dieses Lot ist der angenommene Mittelwert des ersten Einzelkollektivs, das nunmehr als Symmetrieachse benutzt wird, um die noch fehlende Hälfte des ersten Einzelkollektivs spiegelbildlich zu dem vom zweiten Teilkollektiv vermutlich noch nicht oder nur wenig beeinflußten Schenkel der Gesamtverteilung zu ergänzen. Die auf diese Weise erhaltenen Klassenhäufigkeiten werden aus der Zeichnung abgelesen und von den Einzelhäufigkeitsprozenten der Gesamtverteilung subtrahiert. Die auf diese Weise erhaltenen Differenzen ergeben die Einzelhäufigkeitsprozente des zweiten Teilkollektivs. Anschließend sind die Summenhäufigkeitsprozente der Teilkollektive neu zu berechnen und auf ihre Linearität = „Normalität" zu prüfen. Sind beide Teilkollektive normal verteilt, ist die Kurvenaufteilung damit beendet, anderenfalls muß der zuerst angenommene Schnittpunkt so lange um einige Einheiten nach links oder rechts verschoben werden, bis beide Teilkollektive eine Normalverteilung ergeben. Aus dem

Schnittpunkt der Summenhäufigkeitsprozentlinie der Teilkollektive mit der 50%-Linie sind die Mittelwerte und aus dem Neigungswinkel der Geraden die Standardabweichungen ($\sigma = 0{,}34 \cdot b \cdot \operatorname{tg} \beta$, wobei $b$ = Klassenbreite, $\beta$ = Neigungswinkel der Geraden, gemessen zwischen der Geraden und der Ordinate bedeuten) unmittelbar abzulesen.

Diese graphischen Trennverfahren setzen eine große Individuenzahl voraus. Ist ihre Zahl beschränkt, leidet die Zuverlässigkeit der Aussage durch die Diskontinuität des Kurvenverlaufes, die durch rein zufällige Abweichungen der einzelnen Klassenhäufigkeiten von ihren idealen Werten hervorgerufen wird. Da eine Vergrößerung der Klassenbreite die Charakteristika der Gesamtverteilung nicht mehr deutlich hervortreten ließe, haben Gebelein und Heite (1951) für derartige Fälle die Anwendung gleitender Durchschnitte empfohlen. Bei diesem Verfahren wird eine Anzahl Klassen zu einer Gruppe zusammengefaßt, die Klassenhäufigkeiten dieser Gruppe werden gemittelt und der zentralen Klasse zugeordnet. Die Gruppengrenzen werden sodann um eine Klassenbreite verschoben usf. wie oben. Auf diese Weise wird in der Regel ein sehr ausgeglichener Kurvenverlauf mit nur geringer Diskontinuität zwischen benachbarten Klassen, der die Eigentümlichkeit der mehrgipfligen Häufigkeitsverteilung jedoch kaum verändert zeigt, erhalten.

## IV. Experimenteller Teil

### *1. Genetische Untersuchungen*

Die Untersuchung des Gendosiseffektes bei diploiden und autotetraploiden Pflanzen der *Silene armeria* ergab, daß die bei Diploiden von Correns bereits 1912 beschriebene Rotfärbung der Heterozygoten gegenüber den rosafarbigen und weißlichen Homozygoten auch bei den experimentell hergestellten Tetraploiden zu beobachten ist. Aus der Aufspaltung selbstbestäubter tetraploider Duplextypen in 1 *albida*:34 *rubra*:1 *rosea* geht hervor, daß die bei Tetraploidie vorkommenden 3 verschiedenen Heterozygoten alle den bei Diploiden beobachteten Heterosiseffekt zeigen. Es war jedoch nicht möglich, zwischen den einzelnen Heterozygoten eindeutig zu unterscheiden. Zwar konnten mit dem bloßen Auge Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen gesehen werden, doch wurden diese zum Teil auch durch das Alter der einzelnen Blütchen, die in ungleichmäßigen Zeitabständen innerhalb der Trugdolden aufblühen, hervorgerufen. Der Gesamtfarbeindruck ist sehr vom Verhältnis junger zu alten Blüten abhängig, so daß eine einwandfreie Beurteilung des Farb- oder Intensitätswertes sehr schwer ist. Wricke, der die Vorversuche mit diesem Objekt durchgeführt hat[1], versuchte zunächst eine unabhängige Beurteilung des Farbwertes der einzelnen tetraploiden Heterozygoten durch 3 verschiedene Personen. Die Auswertung der Ergebnisse ergab keine genügende Übereinstimmung zwischen den 3 Beobachtern. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde die Anthocyankonzentration innerhalb einer Duplexnachkommenschaft von jeder Pflanze an je 3 Blütchen im gleichen Entwicklungszustand kolorimetrisch gemessen. Sind Unterschiede in den Meßwerten der 3 Heterozygoten vorhanden, müßte eine 3gipfelige Häufigkeitsverteilung erhalten werden, deren Maxima etwa den Mittelwerten der einzelnen Genotypen entsprechen. Ein derartiges Kurvenbild wurde jedoch nicht erhalten. Es ist anzunehmen, daß die umweltbedingte Variabilität der Meßwerte doch beträchtlich ist. Um hierüber einige Auskunft zu erhalten, wurden die bereits gemessenen Pflanzen zurückgeschnitten und unter den gleichen Bedingungen erneut zur Blüte

[1] Meinem Kollegen Dr. G. Wricke danke ich auch an dieser Stelle noch einmal sehr herzlich für die Überlassung seines Materials und seiner Daten, die er aus dem Vorversuch erhalten hat.

gebracht. Von diesen Blüten wurden wiederum Anthocyanextrakte kolorimetrisch gemessen. Wenn die verschieden starke Färbung der heterozygoten Pflanzen vorwiegend vom Genotyp bestimmt würde, müßte eine enge Korrelation zwischen dem ersten und dem zweiten Meßwert bestehen. Der errechnete Korrelationskoeffizient war mit einem Wert von $r = 0{,}26$ und einem $P_{(31)} = 0{,}14$ jedoch nicht

Tabelle 1. *Aufteilung der Triplexnachkommenschaft Nr. 11*[1]

| Klassen | $g$ | $\Sigma g$ | $g$-% | $\Sigma g$-% | $f_1$-% | $f_2$-% | $\Sigma_1$-% | $\Sigma_2$-% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14—14,99 | 1 | 1 | 0,55 | 0,55 | 0,55 | — | 1,37 | — |
| 15—15,99 | 3 | 4 | 1,67 | 2,22 | 1,67 | — | 5,54 | — |
| 16—16,99 | 10 | 14 | 5,56 | 7,78 | 5,30 | 0,26 | 18,73 | 0,43 |
| 17—17,99 | 24 | 38 | 13,33 | 21,11 | 11,44 | 1,89 | 47,26 | 3,59 |
| 18—18,99 | 31 | 69 | 17,22 | 38,33 | 11,98 | 5,24 | 77,13 | 12,34 |
| 19—19,99 | 29 | 98 | 16,11 | 54,44 | 6,88 | 9,23 | 94,29 | 27,76 |
| 20—20,99 | 28 | 126 | 15,56 | 70,00 | 2,00 | 13,56 | 99,28 | 50,39 |
| 21—21,99 | 25 | 151 | 13,89 | 83,89 | 0,29 | 13,60 | 100 | 73,11 |
| 22—22,99 | 17 | 168 | 9,44 | 93,33 | — | 9,44 | — | 88,87 |
| 23—23,99 | 8 | 176 | 4,45 | 97,78 | — | 4,45 | — | 96,29 |
| 24—24,99 | 3 | 179 | 1,66 | 99,44 | — | 1,66 | — | 99,08 |
| 25 und darüber | 1 | 180 | 0,56 | 100 | — | 0,56 | — | 100 |
| $\Sigma$ | 180 | | 100 | | 40,11 | 59,89 | | |
| | | | | $n_i =$ | 72,2 | 107,8 | | |

Tabelle 2. *Aufteilung der Duplexnachkommenschaften Nr. 10, 13, 14, 15 und 17*
(Kurve mit Hilfe gleitender Klassenmittel ausgeglichen)

| Klassen | $\bar{g}$ | $\Sigma\bar{g}$ | $\bar{g}$-% | $\Sigma\bar{g}$-% | $\bar{f}_1$-% | $\bar{f}_2$-% | $\bar{f}_3$-% | $\Sigma_1$-% | $\Sigma_2$-% | $\Sigma_3$-% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| unter 11,9 | 0,2 | 0,2 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | — | — | 0,46 | — | — |
| 12—12,9 | 0,4 | 0,6 | 0,14 | 0,21 | 0,14 | — | — | 1,39 | — | — |
| 13—13,9 | 1,6 | 2,2 | 0,57 | 0,78 | 0,57 | — | — | 5,12 | — | — |
| 14—14,9 | 4,2 | 6,4 | 1,49 | 2,27 | 1,43 | 0,06 | — | 14,42 | 0,16 | — |
| 15—15,9 | 8,2 | 14,6 | 2,91 | 5,18 | 2,66 | 0,25 | — | 31,86 | 0,47 | — |
| 16—16,9 | 13,0 | 27,6 | 4,61 | 9,79 | 3,51 | 1,10 | — | 54,88 | 2,07 | — |
| 17—17,9 | 19,0 | 46,6 | 6,74 | 16,53 | 3,27 | 3,47 | — | 76,28 | 7,15 | — |
| 18—18,9 | 27,4 | 74,0 | 9,72 | 26,25 | 2,16 | 7,56 | — | 90,46 | 18,19 | — |
| 19—19,9 | 38,4 | 112,4 | 13,62 | 39,87 | 1,03 | 12,56 | 0,03 | 97,21 | 36,48 | 0,43 |
| 20—20,9 | 44,8 | 157,2 | 15,89 | 55,76 | 0,32 | 15,39 | 0,18 | 99,30 | 59,01 | 1,30 |
| 21—21,9 | 40,0 | 197,2 | 14,18 | 69,94 | 0,11 | 13,40 | 0,67 | 100 | 78,60 | 5,43 |
| 22—22,9 | 28,8 | 226,0 | 10,21 | 80,15 | — | 8,62 | 1,59 | — | 91,19 | 15,22 |
| 23—23,9 | 20,2 | 246,2 | 7,16 | 87,31 | — | 4,18 | 2,98 | — | 97,30 | 33,48 |
| 24—24,9 | 14,6 | 260,8 | 5,18 | 92,49 | — | 1,38 | 3,80 | — | 99,33 | 56,74 |
| 25—25,9 | 10,8 | 271,6 | 3,83 | 96,32 | — | 0,46 | 3,37 | — | 100 | 77,39 |
| 26—26,9 | 6,4 | 278,0 | 2,27 | 98,59 | — | — | 2,27 | — | — | 91,30 |
| 27—27,9 | 3,0 | 281,0 | 1,06 | 99,65 | — | — | 1,06 | — | — | 97,83 |
| 28—28,9 | 0,8 | 281,8 | 0,28 | 99,93 | — | — | 0,28 | — | — | 99,56 |
| 29 und darüber | 0,2 | 282,0 | 0,07 | 100 | — | — | 0,07 | — | — | 100 |
| $\Sigma$ | 282 | | 100 | | 15,27 | 68,43 | 16,30 | | | |
| | | | | $n_i =$ | 43,06 | 192,97 | 45,97 | | | |

[1] In diesen Tabellen bedeuten: $g$ bzw. $g$ = Häufigkeit (bzw. gemittelte H.) der Meßwerte/Klasse; $\Sigma g$ bzw. $\Sigma\bar{g}$ = Summenhäufigkeit (bzw. gemittelte Sh.), erhalten aus der stufenweisen Addition der Einzelhäufigkeiten, mit der niedrigsten Klasse beginnend; $g$-%, $\bar{g}$-%, $\Sigma g$-%, $\Sigma\bar{g}$-% = Prozentuale Einzel- und Summenhäufigkeiten; $f_i$-% bzw. $\bar{f}_i$-% = durch graphische Aufteilung erhaltene Einzelhäufigkeiten der Teilkollektive 1, 2, ... $i$; $\Sigma_i$-% = die für die Teilkollektive 1, 2, ... $i$ gebildeten prozentualen Summenhäufigkeiten; $\bar{n}_i$ = die anhand der graphischen Aufteilung errechneten Individuenzahlen der Teilkollektive 1, 2, ... $i$.

signifikant von null verschieden, d. h., daß die Umwelt doch einen erheblichen Einfluß auf die Meßwerte haben muß, der nur durch die Änderung der Versuchsbedingungen reduziert werden kann (Wricke, unveröff.). Um diesen Einfluß zu verringern, wurde im Hauptversuch eine wesentlich größere Pflanzenzahl untersucht. Außerdem wurden nunmehr 5 an Stelle von 3 Blüten jeder Pflanze unter möglichst konstanten Bedingungen extrahiert und kolorimetriert.

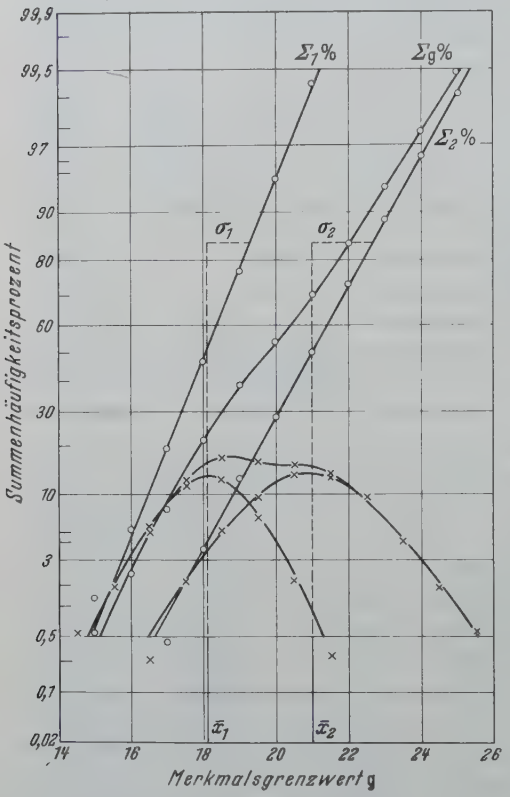



Abb. 1. Graphische Aufteilung des Mischkollektivs der Triplexnachkommenschaft Nr. 11. ×—×—× Häufigkeiten der Einzelhäufigkeitsprozente; ○—○—○ Häufigkeiten der Summenhäufigkeitsprozente. Weitere Erläuterungen im Text

In der Tat konnten nun Verteilungen erhalten werden, deren Charakteristika auf Mischkollektive schließen ließen, die mit Hilfe der bereits beschriebenen Methoden analysiert wurden. In den Tabellen 1 und 2 sind die Häufigkeitsverteilungen der Triplexnachkommenschaft Nr. 11 und der zu einer Gruppe zusammengefaßten Duplexnachkommenschaften Nr. 10, 13, 14, 15 und 17 wiedergegeben. Die in diesen Nachkommenschaften vorkommenden rosa bzw. rosa und weißlichen Homozygoten wurden nicht kolorimetrisch gemessen, da sie für die Unterscheidung der Heterozygoten ohne Belang sind. Die Meßwerte der Triplexnachkommenschaft Nr. 11 wurden unmittelbar in die Tabelle eingetragen, während die der Duplexnachkommenschaften wegen der starken Variabilität der Einzelklassenhäufigkeiten (s. S. 234) zunächst mit Hilfe der Methode der gleitenden Klassenmittel korrigiert wurden, bei der jeweils 5 Klassen zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden.

In den Abb. 1 und 2 ist das Verfahren der graphischen Aufteilung dargestellt. Aus dem Verlauf der Einzelhäufigkeitsprozentkurven ist zu entnehmen, daß sich die verschiedenen Heterozygoten tatsächlich in der Farbintensität unterscheiden müssen: Die Gesamtverteilung der Triplexnachkommenschaft (Abb. 1) zeigt durch die eine Einbuchtung an, daß 2 Teilkollektive vorliegen müssen, die der Duplexnachkommenschaften (Abb. 2) weist 2 Einbuchtungen auf, die auf eine Zusammensetzung aus 3 Teilkollektiven schließen lassen. Der Vergleich der Häufigkeiten der Einzelkollektive ermöglicht es, auf die Verteilung der Genotypen rückzuschließen und die durchschnittlichen Meßwerte der Genotypen zu ermitteln. Aus der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß der Duplextyp, der in diesen Nachkommenschaften mit einer Häufigkeit von 53% (bezogen auf die hier nur betrachteten

und gemessenen Heterozygoten) bei Annahme von Chromosomenspaltung und von 46% bei Annahme von Chromatidenspaltung zu erwarten wäre, gegenüber den beiden anderen Heterozygoten eine mittlere Anthocyanintensität besitzt. Den Schlüssel zu der Frage, ob der Simplex- oder der Triplextyp den höheren Meßwert besitze, erhält man aus dem Vergleich mit der Abb. 1. In dieser Nachkommenschaft wird der Triplextyp bei Annahme von Chromosomenspaltung

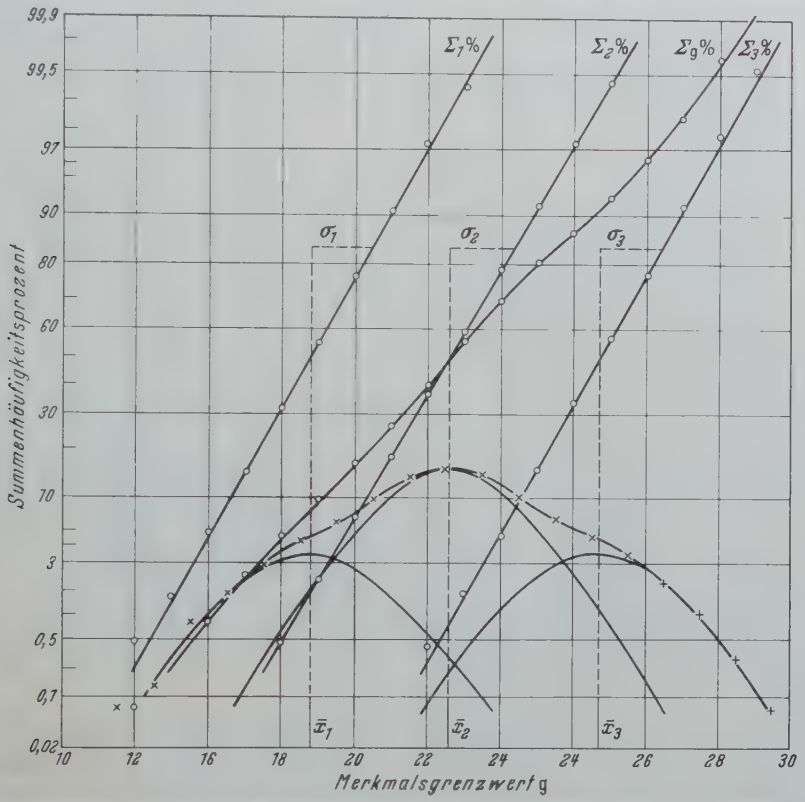



Abb. 2. Graphische Aufteilung des Mischkollektivs der zu einer Gruppe zusammengefaßten Duplexnachkommenschaften Nr. 10, 13, 14, 15 und 17. ×—×—× Einzelhäufigkeitsprozente; o—o—o Summenhäufigkeitsprozente. Weitere Erläuterungen im Text

mit einer Häufigkeit von 66,7%, bei Annahme von Chromatidenspaltung von 64,5% erwartet. Aus der Abb. 1 geht hervor, daß der Triplextyp gegenüber dem weniger häufigen Duplextyp einen höheren Meßwert aufweist[1]. Damit ist die Zuordnung der aus der Aufteilung der Mischkollektive erhaltenen Mittelwerte zu den einzelnen heterozygoten Genotypen wie in Tabelle 3 möglich.

Die Abweichung der Genotypenhäufigkeit von den bei Annahme einer Chromosomenspaltung ($\alpha = 0$) bzw. bei Chromatidenspaltung ($\alpha = 1/7$) zu erwartenden theoretischen Häufigkeiten ist in der Nachkommenschaft des Triplextyps mit

[1] In der vorläufigen Mitteilung (Seyffert 1956) ist versehentlich der Triplex- und Duplextyp verwechselt worden (Tabelle S. 438). Die Zuordnung der Meßwerte zu den einzelnen Genotypen ist dementsprechend unrichtig. Dieser Irrtum geht allein zu Lasten des Autors, Herr Dr. Wricke ist nicht davon betroffen.

einem $P_{(1)} = 0{,}16$ bzw. $P_{(1)} = 0{,}46$ nicht signifikant, die geringere Abweichung von der bei Chromatidenspaltung zu erwartenden Häufigkeit ist ohne Bedeutung. Bedeutsam ist dagegen die Abweichung der innerhalb der Duplexnachkommenschaft beobachteten Zahlen von der Erwartung. Diese Abweichung, die sich in einer zu großen Häufigkeit der Duplextypen äußert, ist so offensichtlich, daß sich eine statistische Prüfung erübrigt. Sie ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß mehrere Nachkommenschaften zusammengefaßt werden mußten, um genügend Individuen zur Kurvenaufteilung zur Verfügung zu haben, und darauf, daß diese Nachkommenschaften an verschiedenen Standorten innerhalb der Versuchsbeete angebaut worden waren.

Tabelle 3. *Übersicht über die aus der Aufteilung der Häufigkeitsverteilungen erhaltenen Mittelwerte und Häufigkeiten der Einzelkollektive*

| Elterlicher Genotyp[1] | Genotyp der Nachkommen[1] | $\bar{x}$ m | $n$ | Ideal | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $\alpha = 0$ | $\alpha = 1/7$ |
| Duplex | Simplex | $16{,}8 \pm 0{,}26$ | 43 | 66 | 76 |
| | Duplex | $20{,}6 \pm 0{,}13$ | 193 | 150 | 130 |
| | Triplex | $24{,}7 \pm 0{,}25$ | 46 | 66 | 76 |
| Triplex | Duplex | $18{,}1 \pm 0{,}14$ | 72 | 60 | 64[2] |
| | Triplex | $21{,}0 \pm 0{,}16$ | 108 | 120 | 116 |

[1] Die Bezeichnung der Genotypen bezieht sich auf die Häufigkeit des $f^{+}_{a}$-Allels (s. S. 241).

[2] Die bei Annahme von Chromatidenspaltung ($\alpha = 1/7$) zu erwartenden Simplextypen mit der Häufigkeit von 7,74 wurden zu der Erwartungshäufigkeit der Duplextypen von 56,13 hinzugerechnet.

### 2. *Biochemische Untersuchungen*

Wie die vorhergehenden Untersuchungen erkennen lassen, besteht zwischen der Rotausfärbung der Heterozygoten und den Faktoren, die diese Färbung bedingen, offenbar eine dosisproportionale Beziehung. Da diese nur bei den Heterozygoten zu beobachten ist, während sich die Homozygoten sehr stark von den Heterozygoten unterscheiden, lag es nahe, zu untersuchen, ob es nicht qualitative Unterschiede zwischen Homo- und Heterozygoten gibt, die Aufschlüsse über die Wechselwirkungen zwischen den Blütenfarbfaktoren geben können.

Wir untersuchten daher zunächst das Blütenfarbmuster der diploiden *albida*-, *rubra*- und *rosea*-Typen papierchromatographisch. Qualitative Unterschiede im Pigmentmuster konnten in keinem Fall gefunden werden. Alle Phänotypen, einschließlich der *albida*-Form, enthielten neben unidentifizierten Anthoxanthinen, deren Zusammensetzung von Phänotyp zu Phänotyp gleich blieb, stets 2 Cyanidinglykoside, die bei *albida* in Spuren, bei *rubra* in hoher Konzentration und bei *rosea* in näherungsweise einem Viertel der *rubra*-Konzentration vorhanden waren. Der Anthoxanthingehalt erschien unverändert. Danach scheint die Genwirkung allein die mehr oder minder starke Ausbildung von Cyanidinglykosiden zu bedingen, eine Wechselbeziehung zwischen Anthocyan und Anthoxanthin besteht offenbar nicht. Als nächstes wurde der Leukoanthocyangehalt in den 3 genannten Phänotypen untersucht.

Hierzu wurden je 1000 mg von weißlichen, roten und rosa Blüten diploider Silenepflanzen genau abgewogen, in der Reibschale zerkleinert, mit je 10 ml 2 n HCl extrahiert und filtriert, die Reibschale wurde mit weiteren 10 ml 2 n HCl nachgewaschen, die, ebenfalls filtriert, zum Extrakt hinzugefügt wurden. Die Filtrate wurden 4mal mit 20 ml Äthylacetat gewaschen, um Anthoxanthine zu entfernen. Aus der wäßrigen Phase wurden je 5 ml entnommen, und 20 min im Wasserbad hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 2 n HCl auf 15 ml aufgefüllt, desgleichen eine unbehandelte 5 ml Probe, die hydrolysierte und unhydrolysierte Probe

wurden kolorimetrisch gemessen. Messung bei 3,8 V mit Grünfilter VG 9, Scala am Multiflexgalvanometer von 0 (= 2 n HCl) bis 150 (= vollständig dunkel).

Wenn Leukoanthocyan in einer Blüte vorhanden ist, muß sich das in einer stärkeren Rotfärbung der hydrolysierten Extrakte äußern. Die Meßwerte der unbehandelten und hydrolysierten Extrakte ergaben folgendes Bild (Tabelle 4).

Aus der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß nur bei den fast völlig anthocyanfreien *albida*-Typen eine Zunahme der Rotfärbung nach der Hydrolyse vorkommt, während bei den anthocyanhaltigen *rubra*- und *rosea*-Formen eine geringe Abnahme der Absorptionswerte zu beobachten ist. die auf die Zerstörung eines Teils der Anthocyane während der Hydrolyse zurückzuführen ist.

Tabelle 4. *Meßwerte der unbehandelten und hydrolysierten Extrakte von diploiden albida-, rubra- und rosea-Typen*

| | *albida* | *rubra* | *rosea* |
|---|---|---|---|
| a) Gemessene Absorptionswerte | | | |
| Unbehandelt . | 19,6 | 93,6 | 42,3 |
| Hydrolysiert. . | 36,4 | 86,4 | 41,4 |
| b) Auf die Eichkurve bezogene Werte | | | |
| Unbehandelt . | 5,03 | 36,58 | 10,71 |
| Hydrolysiert. . | 9,09 | 30,61 | 10,48 |

Daß in weißlichen Blüten tatsächlich Leukoanthocyane vorkommen, kann durch Untersuchung der nach Hydrolyse gefundenen Anthocyanidine nachgewiesen werden. Die rotgefärbten Hydrolysate der *albida*-Typen wurden mit wenig Iso-Amylalkohol versehen und geschüttelt. Nach dem Absetzen wurde die dann rot gefärbte Amylalkoholphase auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll Nr. 2043a in den Lösungsmittelgemischen n-Butanol-2 n-HCl (1:1). n-Butanol-36% HCl-Wasser (7:2:5), m-Kresol-5,5 n-HCl-Eisessig (1:1:1), Eisessig-36% HCl-Wasser (30:3:10), Eisessig-36% HCl-Wasser (3:1:8) und Eisessig 36% HCl-Wasser (5:1:5) absteigend auf 60 × 20 cm Bogen chromatographiert. Die in diesen Lösungsmittelgemischen erhaltenen $R_f$-Werte von 0,68, 0,79, 0,70, 0.47, 0.15 und 0.30 sind charakteristisch für das Anthocyanidin Cyanidin, gleichzeitig chromatographierte authentische Cyanidinproben ergaben die gleichen $R_f$-Werte.

In weißlichen Blüten ist demnach eine Vorstufe der in roten und rosa Blüten vorkommenden Cyanidinglykoside in der Leukoform vorhanden. Da bei *rubra*- und *rosea*-Typen nach der Hydrolyse keine Zunahme der Rotfärbung beobachtet werden kann, ist anzunehmen, daß die Leukovorstufe quantitativ durch Anthocyan ersetzt worden ist.

Auffallend ist, daß die nach der Hydrolyse bei den *albida*-Typen gemessene relative Cyanidinkonzentration von 9,09 (Tabelle 4) im Vergleich mit der des *rubra*-Typs von 30,61 sehr niedrig ist, da doch zu erwarten wäre, daß beide Werte etwa gleich groß sind. Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß bei der Hydrolyse nur ein Teil der Leukoanthocyane in Cyanidin überführt wird, so daß die augenscheinliche Differenz zwischen Befund und Erwartung durchaus verständlich wird.

## V. Diskussion

Die nachfolgende Diskussion wird in 2 Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Frage diskutiert, ob das bei *Silene armeria* beobachtete Heterosisphänomen durch echte Superdominanz zu erklären ist oder ob es andere Interpretationsmöglichkeiten gibt, während im zweiten die Wechselwirkungen zwischen den „Allelen" des untersuchten Locus besprochen werden.

### *1. „Superdominanz"*

Correns (1912) hat als erster die Vererbung der Blütenfarbe bei *Silene armeria* untersucht. Er besaß 3 konstante Sippen, eine sehr blaßrosa *(„albida")*, eine rosa *(„rosea")* und eine purpurrot gefärbte *(„rubra")*. Kreuzungen der Sippen *albida* × *rosea* ergaben in allen Fällen einen immerspaltenden *rubra*-Typus, der sich phänotypisch nicht von dem konstant roten unterscheiden ließ. Correns erklärte das Zustandekommen dieses heterozygot roten mit der Annahme gekoppelter Faktoren, eines Farbfaktors ($F_2$) und eines Steigerungsfaktors ($S$). Um die schwache Rotfärbung der *albida*-Typen erklären zu können, nahm Correns außerdem die Existenz eines weiteren Farbfaktors ($F_1$) an. Seine Genformeln lauten demnach:

$$albida = \frac{F_1}{F_1}\,\frac{f_2 S}{f_2 S}, \qquad rubra = \frac{F_1}{F_1}\,\frac{f_2 S}{F_2 s}, \qquad rosea = \frac{F_1}{F_1}\,\frac{F_2 s}{F_2 s}$$

Die Entstehung roter Phänotypen ist demnach auf eine Wechselwirkung zwischen dem dominanten Allel des Farbfaktors $F_2$ und dem des Steigerungsfaktors $S$ zurückzuführen. Eine Wechselwirkung zwischen $F_1$ und $S$ besteht nicht.

Zur Überprüfung seiner Koppelungshypothese hat Correns zahlreiche Nachkommenschaften auf das Vorkommen konstant roter Austauschtypen untersucht. Nach Kappert (pers. Mitteilung) sind von Correns mehr als 1000 Nachkommenschaften, von Kappert selbst mindestens weitere 500 geprüft worden. Auch Brieger (Kappert pers. Mitteilung) soll sich in großem Ausmaß an der Suche nach Austauschtypen beteiligt haben, jedoch ist es bisher keinem der genannten Autoren gelungen, einen konstant roten Typus zu finden.

Es ist daher zu überlegen, ob die Definition von Correns, die wir heute wahrscheinlich als „pseudo-overdominance" (Mangelsdorf 1952) bezeichnen würden, d. h. als eine durch Pseudoallele bedingte Heterosis, richtig ist oder ob nicht die Annahme echter Superdominanz besser zu rechtfertigen wäre. Es gilt also zunächst zu entscheiden, ob Allele oder Pseudoallele für das beobachtete Phänomen verantwortlich sind.

Wird eine für Pseudoallele charakteristische Austauschhäufigkeit in der Größenordnung von mindestens $1 \cdot 10^{-4}$ (z. B. *bithorax*/*bithoraxoid*, Lewis 1951) bis höchstens $1 \cdot 10^{-3}$ (z. B. $biotin_1$/$biotin_2$, Pontecorvo 1953) angenommen, dann ist bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0{,}05$ an Stelle eines Austauschtyps keinen zu finden, eine Zahl von $n = 29957$ Nachkommenschaften im ersten Fall und von $n = 2996$ im zweiten erforderlich, um wenigstens einen konstant roten Austauschtyp zu erhalten[1]. Wird die von Correns und Kappert untersuchte Zahl der Nachkommenschaften zusammengefaßt, so ist mit $n = 1500$ weder die untere noch die obere Grenze überschritten. Bei $n = 1500$ Nachkommenschaften müßte die Austauschhäufigkeit kleiner als $1{,}99 \cdot 10^{-3}$ sein, wenn bei der angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit keine Austauschtypen mehr gefunden werden sollen[2]. Das heißt, daß es anhand des bisher untersuchten Materials nicht möglich ist, auf diesem Wege eindeutig zwischen Allelie und Pseudoallelie zu unterscheiden.

---

[1] Berechnet nach der Poisson-Verteilung: $W_{(x)} = \frac{n q^x e^{-n q}}{x!}$, $W_{(0)} = e^{-nq}$, $n = -\ln W_{(0)}/q$.

[2] $q = -\ln W_{(0)}/n$.

*Für* die Annahme der Pseudoallelie sprechen zunächst 2 Beobachtungen: einerseits die Tatsache, daß aufgrund der oben angeführten Berechnungen die Pseudoallelie nicht als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, und andererseits die Beobachtung, daß die „Allele" eine einander sehr ähnliche biochemische Wirkung besitzen, eine Eigenschaft, die für Pseudoallele charakteristisch ist.

*Gegen* die Annahme der Pseudoallelie ist anzuführen, daß bei *Silene* der für Pseudoallele im engeren Sinne so charakteristische „cis-vection-Effekt", der sich nach Lewis (1954) in der phänotypisch unterschiedlichen Ausprägung des cis-Typs $AB/ab$ gegenüber dem trans-Typ $Ab/aB$ äußert, nicht zu beobachten ist. Die konstant rote Sorte, der nach Correns' Formulierung der Genotyp $F_2S/F_2S$ zukommt, unterscheidet sich weder phänotypisch noch papierchromatographisch vom heterozygot roten trans-Typ $F_2s/f_2S$. Allerdings ist dieser Vergleich nicht ganz zutreffend, da die weißliche Sippe mit dem Genotyp $f_2s/f_2s$ in unserem Material nicht vorhanden ist und somit nicht die heterozygote cis-Form $F_2S/f_2s$, sondern nur die Homozygote $F_2S/F_2S$ mit der trans-Form verglichen werden kann. Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, daß dieser Typ sehr vom „echten" cis-Typ abweicht. Das Ausbleiben des cis-vection-Effektes, die ähnliche biochemische Wirkung der Faktoren, ihre komplementäre Wirkung in der Heterozygoten und die offensichtlich sehr enge Koppelung lassen die sehr wahrscheinliche Annahme zu, daß es sich bei *Silene armeria* nicht um Pseudoallelie, sondern vielmehr um einen Komplexlocus im Sinne Dunns (1954) handelt. Es wäre richtiger, die Gene als zum gleichen Locus gehörig zu symbolisieren und ihnen beispielsweise die folgenden Bezeichnungen zu geben:

$$albida = \frac{f_l^+ f_a}{f_l^+ f_a}, \quad rubra = \frac{f_l^+ f_a}{f_l f_a^+}, \quad rosea = \frac{f_l f_a^+}{f_l f_a^+}.$$

Die Annahme eines weiteren Farbfaktors ($F_1$), um die schwach rosa Färbung der *albida*-Typen erklären zu können, erscheint als überflüssig, da aus neueren Untersuchungen an anderen Objekten hervorgeht, daß auch das rezessive Allel eines auf die Pigmentstruktur qualitativ wirkenden Faktors in geringem Umfang das gleiche Phänom wie das dominierende Allel hervorbringen kann (Seyffert, 1959).

### *2. Geninteraktion*

Wie im experimentellen Teil beschrieben, beruht die Heterosisleistung des *rubra*-Typs auf der Interaktion der Gene $f_l^+$ und $f_a^+$. Das Gen $f_l^+$ ist für die Bildung des Leukocyanidins verantwortlich, $f_a^+$ bedingt die Entstehung von Cyanidinglykosiden, die nur vonstatten gehen kann, wenn Leukocyanidin vorhanden ist. Beide Allele allein können in nennenswertem Umfang keinen Farbstoff bilden.

Ähnliche Heterosisfälle, deren stoffliche Grundlagen mehr oder weniger bekannt sind, sind bei Mikroorganismen mehrfach beobachtet worden. Sie treten nicht selten bei Allelie-Tests in Erscheinung, wenn 2 auxotrophe Mutanten mit dem gleichen Nährstoffbedürfnis gekreuzt werden und dann den Wildtyp ergeben. Dies gilt als Beweis dafür, daß beide Mutanten zwar dem gleichen Cistron, im Sinne Benzers (1957), angehören, im engeren Sinne jedoch nicht allel sind.

Es wäre in diesem Zusammenhang zu überlegen, ob der bei höheren Organismen so oft gebrauchte Ausdruck der „monogenen Heterosis" nicht besser durch

den Terminus „unilokale Heterosis“ ersetzt würde, da es wohl nur in den seltensten Fällen möglich sein dürfte, eindeutig zwischen Allelie und Pseudoallelie zu unterscheiden.

Aus den experimentellen Befunden geht weiterhin hervor, daß das $f_a^+$-Allel bei den 3 verschiedenen Heterozygoten der autotetraploiden *Silene*-Pflanzen eine Dosiswirkung ausübt. Eine entsprechende Dosiswirkung des $f_l^+$-Allels konnte bei der vorliegenden Versuchsanstellung nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß das $f_a^+$-Allel, das eine bestimmte biochemische Reaktion bedingt, nicht alternativ, sondern dosisproportional wirkt. Die unvollständige Dominanz eines Gens mit biochemisch definierbarer Wirkung wurde auch in einem anderen Fall, bei *Primula malacoides* (Seyffert, 1959), eindeutig nachgewiesen. Sie zeigt, daß die von der biochemischen Genetik an haploiden Organismen gewonnenen Ergebnisse, die leicht zu der Vorstellung führen können, daß in einen Syntheseprozeß eingreifende Gene alternativ wirken, in vielen Fällen sicherlich einer Revision bedürfen.

Bemerkenswert ist, daß die der Dosis des $f_a^+$-Allels proportionale Heterosisleistung bei allen 3 möglichen Heterozygoten der Tetraploiden zu beobachten ist, d. h., daß sie stets nur vor dem „Hintergrund“ des $f_l^+$-Allels manifest werden kann. Es muß hier also eine interallele Wechselwirkung vorliegen, die nur durch die unselbständige Wirkung der „Allele“ erklärt werden kann. Damit würde das Gegenbeispiel zu der im ersten Teil der Arbeit (Seyffert 1957) beschriebenen unvollständigen Dominanz unsere Hypothese bestätigen, daß das Charakteristikum der unvollständigen Dominanz die *selbständige*, das der Superdominanz, in diesem Fall der „unilokalen“ Heterosis, die *unselbständige* Wirkung der „Allele“ ist.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Kappert darf ich auch an dieser Stelle für die Förderung der Arbeit und für anregende Diskussionen herzlich danken. Mein Dank gilt ferner der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“, die die Durchführung der Arbeiten ermöglichte.

## Summary

Investigations made on diploid and experimentally produced autotetraploid *Silene armeria* have brought about the result, that the red flower colour of the diploid heterozygotes, first described by Correns (1912), in contrast to the whitish and pink homozygotes, is likewise to be observed in the three tetraploid heterozygotes.

By means of colorimetric measurements it was possible to find a gene dosage effect on the tetraploid heterozygotes (vide Figs. 1 and 2, and Table 3). Paper chromatography of the flower colour pigments of the three diploid phenotypes did not yield any difference in the quality of the pigments. With biochemical methods, however, we found that the nearly colourless "*albida*"-types contain leuco-cyanidin, whereas in coloured flowers cyanidin glycosides occur instead of leuco-cyanidin.

The question is discussed, whether this phenomenon of heterosis depends on alleles, pseudoalleles or a complex-locus. The latter possibility is the most probable one.

## Literatur

Benzer, S.: The elementary units of heredity. In: W. D. McElroy and B. Glass, The chemical basis of heredity, p. 70. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — Correns, C.: Die neuen Vererbungsgesetze. Berlin 1912. - Crow, J. F.: Dominance and overdominance. In: J. W. Gowen, Heterosis, p. 282. Ames: Iowa State College Press 1952. — Daeves, K.: Rationalisierung durch Großzahlforschung. Düsseldorf: Verl. Stahleisen 1952. — Daeves, K., u. A. Beckel: Großzahlforschung und Häufigkeitsanalyse. Weinheim: Verl. Chemie 1948. — Dunn, L. C.: The study of complex loci. Proc. 9. Intern. Congr. Genet. 1954, Fd. I, p. 155. Caryologia (Suppl.) **6**. — Emerson, S.: A physiological basis for some supressor mutations and possibly for one gene heterosis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **34**, 72 (1948). — Goldschmidt, R. B.: Theoretical genetics. Berkeley: Univ. Calif. Press 1955. — Green, M. M., and K. C. Green: A cytogenetic analysis of the lozenge pseudoalleles in *Drosophila*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 708 (1956). — Kappert, H.: Die vererbungswissenschaftlichen Grundlagen der Züchtung. Berlin: Parey 1953. — Kaudewitz, F.: Transduktion. In: Chemie der Genetik, S. 104. Berlin: Springer 1959. — Laughnan, J. R.: Structural and functional bases for the action of the A alleles in maize. Amer. Naturalist **89**, 91 (1955). — Lewis, E. B.: Pseudoallelism and gene evolution. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 159 (1951). — The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. Amer. Naturalist **88**, 225 (1954). — Some aspects of position pseudoallelism. Amer. Naturalist **89**, 73 (1955). — Mangelsdorf, A. J.: Gene interaction in heterosis. In J. W. Gowen, Heterosis, p. 320. Ames: Iowa State College Press 1952. — Pontecorvo, G.: The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. **5**, 141 (1953). — Seyffert, W.: Vorläufige Mitteilung über Untersuchungen zur Gendosiswirkung. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 435 (1956). — Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen. I. Die unvollständige Dominanz des *El*-Faktors von *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 56 (1957). — Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen. III. Der Dosiseffekt eines die Methylierung von Anthocyanen kontrollierenden Gens. Naturwiss. **46**, 271 (1959). — Wricke, G.: Ein Fall von Superdominanz bei einer experimentell hergestellten Autotetraploiden von *Arabidopsis thaliana*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 47 (1955).

Dr. W. Seyffert, Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität Berlin, Berlin-Dahlem, A. Thaer Weg 6

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 244—250 (1959)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen

# ÜBER DIE MUTATION *br* (BRAUNÄUGIG) BEI *EPHESTIA KÜHNIELLA*

Von

ALFRED KÜHN und ALBRECHT EGELHAAF

Mit 11 Textabbildungen

*(Eingegangen am 13. April 1959)*

Die Mutation *br* (*braunäugig* KÜHN 1957) verändert den normalen Verlauf der Ommochrombildung. Die Imaginalaugen haben einen anderen *Farbton* als die Wildaugen. Mit dem Ostwald-Farbkörper gemessen (Ab. 1a) liegt das Maximum der *br*-Augen auf der 2. Orangetafel (Farbkörpertafel 5), das der Wildaugen auf der 1. (4). Das mehr gelbliche Dunkelbraun der +-Augen reicht noch mit etwa 20% auf die Tafel 3 (3. Gelb), der mehr rötliche Farbton der *br*-Augen noch etwas auf Tafel 6. Die +- und die *br*-Kurve überschneiden einander nur wenig. Sehr weit übergreift die Farbkurve der Mutante *a* (rotäugig) die der beiden anderen Genotypen. Die *Helligkeitsbereiche* der *br*- und der Wildaugen überdecken einander erheblich, die *a*-Kurve liegt weit ab (Abb. 1b). Im *Fluoreszenzmuster* ähneln *br*-Augen der Wildform sehr, unterscheiden sich also ganz von *a*, wie der unmittelbare Anblick und die Fluorometerkurven (Abb. 2) zeigen. Wenn man Methanol/HCl-Extrakte papierchromatographisch mit Ameisensäure/Methanol/Salzsäure (nach BUTENANDT, BIEKERT u. LINZEN 1958, aber mit etwas veränderten Mengenverhältnissen: 80 [85%ig] : 15 : 0,5) entwickelt, tritt der Unterschied in der Ommochrombildung zwischen *br*- und +-Augen deutlich hervor.

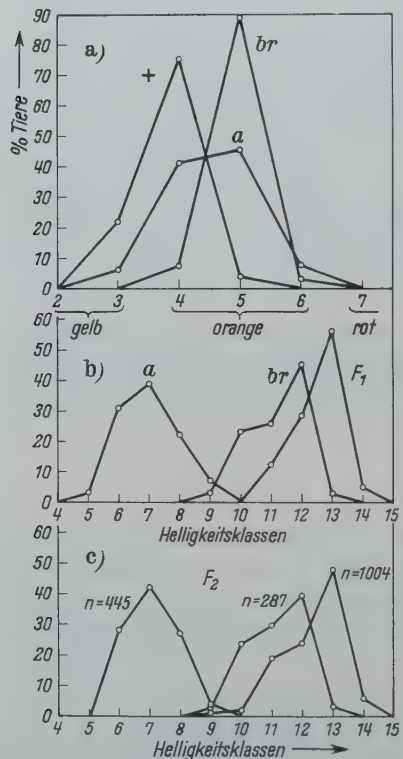



Abb. 1a—c. Variantenverteilung nach dem Ostwald-Farbkörper (Einrichtung und Meßverfahren s. KÜHN u. BERG 1955). a Farbwerte von Reinzuchten von *br*, *a*, +. b, c Helligkeitswerte, b von Reinzuchten und $F_1$. c $F_2$. Anzahlen: in a und b: *br* und *a* je 250, + 100, $F_1$ $n = 226$

Die Köpfe wurden in Äther vorextrahiert, getrocknet, zerrieben und in Methanol/HCl extrahiert. Die Rohextrakte wurden auf den Papieren Schleicher & Schüll 2043b oder Macherey & Nagel 2214 aufsteigend entwickelt. Sie lieferten schärfere Zonen als durch

Ausfällen gereinigte Pigmentpräparate oder reine Vergleichssubstanzen[1]. Das Redoxverhalten wurde durch Aufsprühen von essigsauren Lösungen von $NaNO_2$ (Gelbfärbung) bzw. $NaHSO_3$ (Rotfärbung) geprüft. Beim Ommin erfolgte im Gegensatz zu den Stoffen I, II und III der Farbumschlag weniger rasch, aber ebenso eindeutig.

Bei der *Wildform* folgen im eindimensionalen Chromatogramm (Abb. 3) Zonen verschiedener Farbe aufeinander. Am nächsten der Startlinie liegt eine violette

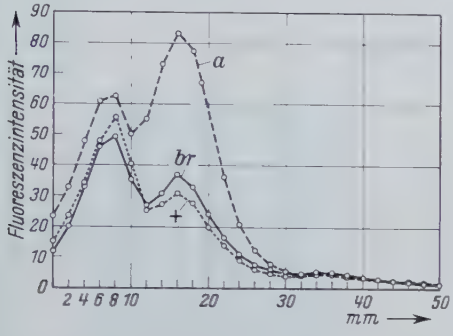
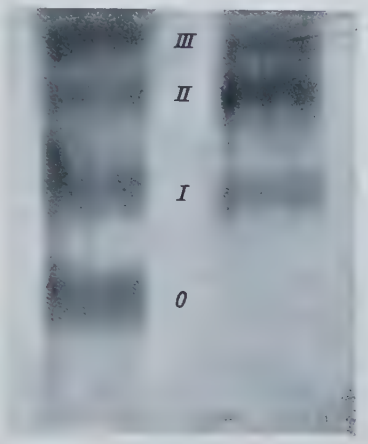



Abb. 2




\+ Abb. 3 *br*

Abb. 2. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme (Verfahren s. Kühn 1955) von Köpfen der Genotypen +, *a* und *br*. Durchschnittswerte von je 10 Einzelkopfchromatogrammen. Abszisse: Folge der gemessenen 2 mm-Abschnitte der Chromatogrammstreifen

Abb. 3. Chromatogramme von Methanol/HCl-Extrakten von je 40 Köpfen von + und *br* mit HCOOH/Methanol/HCl entwickelt. *O* Ommin

Zone, die sich als *Ommin* identifizieren läßt (Vergleichschromatographie, Redoxverhalten, saure Hydrolyse[2]) das von Butenandt, Biekert u. Linzen (1958) schon in den Augen von *Ephestia* nachgewiesen wurde. Dann folgt ein roter Bereich (*I*), hierauf ein schwacher orangefarbiger Streifen. Am weitesten ist eine gelbbraune Substanz gewandert (*III*). Bei *br* fehlt vollständig das Ommin, das bei der Wildform und bei der Mutante *bch* (*biochemica* Hadorn u. Kühn 1953) den Augen den dunklen Farbton gibt. Dagegen ist die Zone *II* bei *br* breit und intensiv rot. Im zweidimensionalen Chromatogramm (in der 2. Laufrichtung mit Phenol ent-

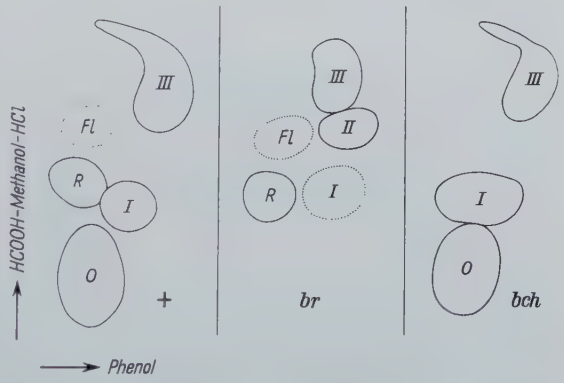



Abb. 4. Fleckmuster aus zweidimensionalen Chromatogrammen von Methanol/HCl-Extrakten aus je 60 Köpfen von +, *br* und *bch*. *O* Ommin, *R* roter Farbstoff (Pterinpigment), *Fl* fluoreszierender Stoff (ein Pteridin), *I*, *II*, *III* Stoffe mit Redoxverhalten. III = Xanthommatin

[1] Für die Überlassung der reinen Vergleichssubstanzen danken wir Herrn Professor Butenandt.

[2] Im HCOOH—HCl-Hydrolysat wurde außer einem roten Pigment mit Redoxverhalten (Farbstoff IV, Butenandt u. Neubert 1958) noch 3-Hydroxy-kynurenin nachgewiesen.

wickelt) werden in dem roten Abschnitt über dem Ommin 2 Flecke voneinander getrennt (Abb. 4). Der eine von ihnen (mit dem niedrigeren $R_f$-Wert im Phenol, *R*) ist der rote Farbstoff (ein Pterinpigment), der *a*-Augen färbt; er ist auch bei + vorhanden, fehlt aber bei der Mutante *bch*. Der andere Fleck (*I*) ist bei *br* weniger intensiv gefärbt als bei + und *bch*. In der folgenden Zone erscheinen bei *br* ebenfalls 2 Flecke, ein schwacher orangefarbiger (*Fl*) und ein intensiv roter (*II*), der bei + und *bch* fehlt. Das Ommin, die Flecke *I*, *II* und *III* absorbieren durchfallendes UV-Licht stark und erscheinen dunkel; *R* und *Fl* fluoreszieren: *R* schwach rot, *Fl* leuchtend blau. *Fl* fehlt, wie *R*, bei der Mutante *bch* mit ihrem verringerten Bestand an Pteridinen, die bei + und *a* nachgewiesen sind (Hadorn u. Kühn 1953, Kühn u. Berg 1955, Reisener-Glasewald 1956, Viscontini, Kühn u. Egelhaaf 1956).

Der Fleck *III* wird durch sein charakteristisches Redoxverhalten, durch seine $R_f$-Werte in verschiedenen Laufmitteln und sein Absorptions-

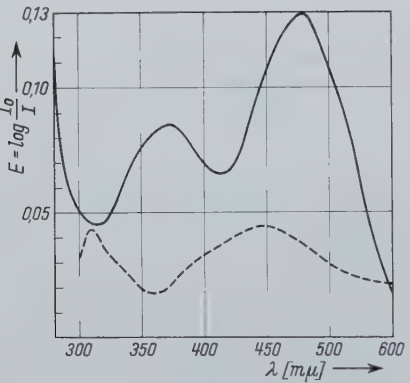



Abb. 5. Absorptionsspektrum der Substanz des Flecks *III* (= Xanthommatin) extrahiert. ——— Aufgenommen in 2 n HCl, – – – – reduziert mit $SnCl_2$

Abb. 6. Ausschnitt aus einem Chromatogrammblatt mit $F_2$-Spaltung. Nach Entwicklung mit Propanol/$NH_3$ getrocknet und mit HCOOH/Methanol/HCl nochmals entwickelt. Auf der Startlinie die Trümmer der Chitinteile der aufgepreßten Köpfe

spektrum (Abb. 5) als *Xanthommatin* (Butenandt, Schiedt, Biekert u. Kornmann 1954) erwiesen, das auch als ein Augenfarbstoff der Schmeißfliege gefunden wurde (Butenandt u. Neubert 1955). Die Flecken *I* und *II* zeigen das für Ommochrome kennzeichnende Redoxverhalten. Der Vergleich mit Rhodommatin und Ommatin D (Butenandt, Schiedt, Biekert u. Kornmann 1954, Butenandt, Biekert u. Beckmann 1957) ergab keine Übereinstimmung in den $R_f$-Werten in verschiedenen Laufmitteln, vor allem Phenol. Der Fleck *I* unterscheidet sich auch im Farbton von den Vergleichssubstanzen. Der rote Fleck *II* konnte auch nicht mit dem durch saure Hydrolyse aus Ommin gewonnenen „Farbstoff IV" (Butenandt u. Neubert 1958) identifiziert werden.

Die chromatographische Untersuchung zeigt, daß *die Ommochrombildungskette der Wildform durch die Mutation + → br vor der Omminbildung abgebrochen*

*wird*. Ob der nur in den Augen von *br* gefundene rote Stoff (*11*) eine Durchgangsstufe der normalen Omminbildung ist oder einer Umleitung der Bildungsprozesse durch *br* entstammt, soll die Untersuchung der Pigmentbildung in den Augen während der Puppenentwicklung aufzuklären versuchen.

Daß die zur Braunäugigkeit führende Mutation kein Allel in der *a*-Serie schafft, in der $a^k$ („kaffeebraun" Caspari 1933, Piepho 1935, Plagge 1935, Kühn 1948) phänotypisch *br* ähnlich ist, zeigt die *Kreuzung* der neu aufgetretenen braunäugigen Mutante mit *a*: Die $F_1$ hat wildfarbige Augen (Abb. 1 b). In $F_2$ erscheinen Tiere mit wildfarbigen, braunen und roten Augen. Nach den Ostwald-Werten lassen sie sich nicht eindeutig trennen (Abb. 1 c). Das gelingt aber chromatographisch. Alle Köpfe der $F_2$-Tiere wurden auf Chromatographierpapierblätter nebeneinander aufgepreßt mit jeweils beigeschriebenem Ostwald-Wert, dann wurde zuerst mit Propanol/$NH_3$ entwickelt (Hadorn u. Kühn 1953).

Abb. 7. Parabiose zwischen Puppen verschiedener Genotypen. Von dem Hinterende der einen Puppe wurde etwas weniger, von dem der anderen etwas mehr abgeschnitten, die eine in die andere hineingesteckt, und beide wurden durch einen Ring aus Bienenwachs verbunden

Da + - und *a*-Tiere im Fluoreszenzmuster ganz verschieden sind (Farbphotos: Kühn u. Berg 1955, Abb. 7), lassen sich die *a*-Individuen sofort aussondern; *br* und + sind dagegen nicht zu unterscheiden. Entwickelt man nun aber die Blätter noch einmal in derselben Richtung mit HCOOH/Methanol/HCl, so laufen die zuerst im Startfleck zurückgebliebenen Ommochrome, und jedes *br*-Individuum wird sicher bestimmt, da ihm das Ommin fehlt (Abb. 6).

Tabelle 1. *$F_2$ der Kreuzung der braunäugigen Mutante mit der Mutante a. 1736 Tiere aus 10 Zuchten*

| Augenfarbe | wild | rot | | braun |
|---|---|---|---|---|
| Genotypen . | $\frac{+}{\cdot}\ \frac{+}{\cdot}$ | $\frac{+}{\cdot}\ \frac{a}{a}$ | $\frac{br}{br}\ \frac{a}{a}$ | $\frac{br}{br}\ \frac{+}{\cdot}$ |
| Anzahlen . | 1004 | 445 | | 287 |
| Spaltzahlen | 9,2 | 4,1 | | 2,7 |
| $m_E$ . . . . | ±0,19 | ±0,16 | | ±0,15 |

Die Spaltzahlen mit den angenäherten Verhältnissen 9:4:3 (Tabelle 1) lassen schließen, daß die *br*/*br*;*a*/*a*-Augen rot sind. Das wird bestätigt durch die Fortzucht Rot- und Braunäugiger aus $F_2$ (Tabelle 2): Die Zuchten der Rotäugigen spalten nie; die der Braunäugigen in vielen Fällen im Verhältnis 3:1, sind also z. T. für *a* heterozygot. *Die Mutation a unterdrückt die Ommochrombildung vollständig.*

Tabelle 2. *Nachzuchten aus $F_1$ der Tabelle 1.* $n_z$ = Anzahl der Zuchten

| Augenfarbe | rot | braun | $n_z$ |
|---|---|---|---|
| Rotäugige × Rotäugige . . . | 1752 | — | 20 |
| Braunäugige × Braunäugige . | — | 1451 | 17 |
| | 312 (0,97) | 968 (3,03) | 15 |

Weitere Aufschlüsse gaben *Parabiosen* (Abb. 7). Vereinigung von + mit *br* verändert weder die Augenfarbe noch das Fluoreszenzmuster der Partner: die Omminbildung in den *br*-Augen kann also nicht durch einen im Blut zirkulierenden +-Stoff in Gang gesetzt werden. Dagegen *bewirkt eine br-Puppe*

*Augenausfärbung eines a-Partners. Zugleich wird auch das a-Fluoreszenzmuster nach dem +-Muster hin verschoben* (Abb. 9). Die *br-Puppe* liefert also für die Ommochrombildung in *a* nötige Vorstoffe. Ihr Gehalt an *Kynurenin* und *3-Hydroxy-kynurenin*, wie in $a^+$-Puppen (EGELHAAF 1957), ließ sich feststellen. Wie bei der Wildform zeigt der Kynureningehalt einen hohen Anstieg und wieder Abfall während der Augenausfärbung (Abb. 8).

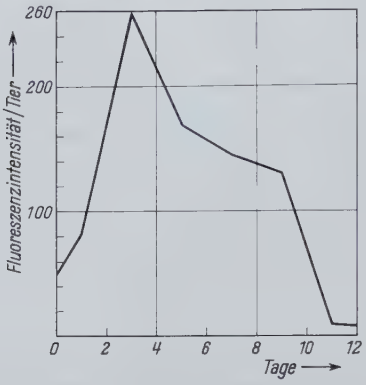



Abb. 8. Kynureningehalt während der Entwicklung der *br*-Puppe. Jedem Kurvenpunkt liegt der Durchschnittswert aus 6 Einzelbestimmungen zugrunde

Wie bei der Vereinigung von + oder *wa* mit *a* (KÜHN 1956) ist der Blutaustausch zwischen den Parabiosepartnern offenbar nicht immer gleich ausgiebig, und dementsprechend variiert der Grad der Verdunkelung der *a*-Augen (Tabelle 3). Aber in den meisten Fällen ist die Verschiebung in den Helligkeitsklassen gegenüber den *a*-Kontrollen sehr ausgeprägt. Bisweilen werden die Augen des *a*-Partners dunkler als die der den wirksamen Stoff liefernden *br*-Puppe.

Tabelle 3. *Verteilung der Pigmentierungsstärke bei den Partnern von Parabiosen zwischen br- und a-Mutanten und bei den Kontrollen*

| | | Helligkeitsstufen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 |
| Parabiosepartner | *br* | | | 9 | 17 | 1 | |
| | *a* | | 7 | 12 | 5 | 3 | |
| Kontrollen . . . | *br* | | | 5 | 14 | 1 | |
| | *a* | 3 | 16 | 1 | | | |

Tabelle 4. *Änderung des Fluoreszenzmusters von a-Parabiosepartnern, ausgedrückt durch das Verhältnis (α) des 1. zum 2. Gipfel der Fluoreszenzkurven, mit dem Grad der Augenverdunkelung*

| Helligkeitsstufen | α-Werte | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 | 2,0 | 2,2 |
| 15 | | | | | | | | 3 | |
| 13 | | | | | 2 | 2 | 1 | | |
| 11 | | | | 5 | 2 | 1 | 1 | | |
| 9 | 4 | 1 | 1 | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | |

Dem Grad der Augenausfärbung entspricht auch die Veränderung des Fluoreszenzmusters (Abb. 9). Ein Maß für die Angleichung des *a*-Musters an + ist das Verhältnis ($\alpha$) zwischen den Fluoreszenzwerten des 1. und 2. Gipfels der Fluorometerkurve (Tabelle 4).

Die Tatsache, daß das Fluoreszenzmuster der *br*-Augen dem +-Muster entspricht, zeigt, daß die Herabsetzung der Pteridine, wie sie durch das Gen $a^+$ (HADORN u. KÜHN 1953), durch $a^+$-Parabiosepartner (KÜHN 1956) oder durch Kynurenininjektion in *a*-Puppen (KÜHN u. EGELHAAF 1955) erzielt wird, nicht erst durch die Omminbildung, sondern schon durch die Entstehung von Ommatinen bewirkt wird.

Die Veränderung der Ommochrombildung durch *br* erstreckt sich auch auf die *Pigmentierung der Hoden*, deren Färbung schon von CASPARI (1933) festgestellt wurde. In den Hoden wird kein rotes Pterinpigment gebildet, sie verdanken ihre Färbung nur Ommochromen; bei *a* sind sie farblos. Bei *br* sind sie heller als bei + (Abb. 10): blaß rötlich gegenüber dem Bräunlichviolett der Wildhoden. Daß

bei + in der Hodenhülle Ommin gebildet wird, hat schon BECKER (1942) festgestellt; bei *br* fehlt es (Abb. 11). Ferner ist im Gegensatz zu + auch kein Xanthommatin vorhanden, nur die Flecke *I* und *II* machen das Ommochrommuster aus. Eine Spur von *II* findet sich auch beim Wildhoden.

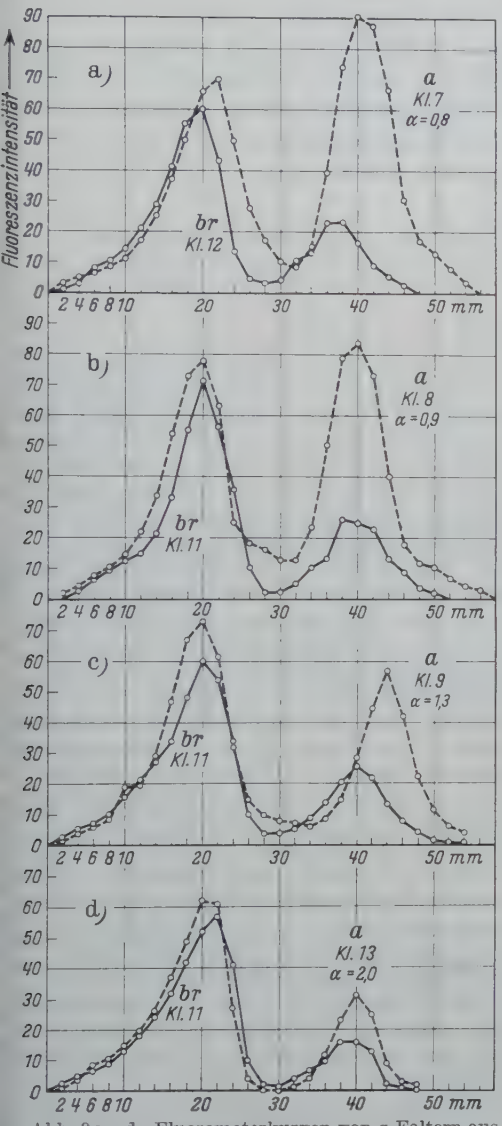



Abb. 9a—d. Fluorometerkurven von *a*-Faltern aus Parabiosen mit *br*; verschieden starker Wirkung des *br*-Partners. *Kl.* Helligkeitsklasse, α Verhältnis des 1. zum 2. Gipfel der *a*-Kurve

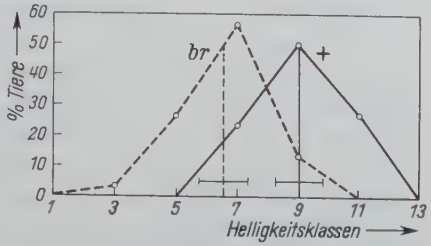



Abb. 10. Variantenverteilung der Pigmentierungsstärke der Hoden von je 30 *br*- und +-Tieren. M ± 3 m

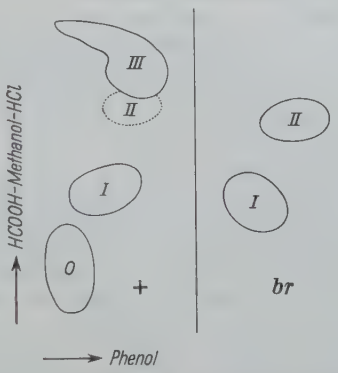



Abb. 11. Fleckmuster in zweidimensionalen Chromatogrammen von Methanol/HCl-Extrakten von je 200 Hoden von + und *br*

Eine die Hodenfarbe zu rot herabsetzende Mutante (*rt*) von *Ephestia kühniella* hat CASPARI (1943) gefunden (CASPARI u. BLOMSTRAND 1956). Sie beeinflußt die Augenpigmentierung nicht, während aus den Kreuzungen mit *br* immer die veränderte Augenpigmentierung und die Hodenaufhellung verknüpft herauskommen. Die *rt*/*rt*;*a*/*a*-Hoden sind farblos. Die Farbe der *rt*-Hoden beruht auf Ommochromen; doch ist deren Natur nicht bekannt.

## Zusammenfassung

Die Mutation *br* unterdrückt die Omminbildung in den Imaginalaugen und in den Hoden; dabei entsteht ein im Wildauge nicht vorhandener roter Farbstoff, der das charakteristische Redoxverhalten der Ommochrome zeigt. Im Hoden von *br* fehlt das Xanthommatin.

In *a*/*a*;*br*/*br*-Augen wird kein Ommochrom gebildet; *a* unterdrückt die Ommochrombildung vollständig.

Das Fluoreszenzmuster der *br*-Augen gleicht dem der +-Augen; also wird die Senkung der Pteridinbildung gegenüber *a* nicht erst durch die Omminbildung, sondern auch schon durch die Entstehung von Ommatinen bewirkt.

In Parabiosen mit + werden die *br*-Augen nicht verändert; *br*-Partner bewirken die Ausfärbung der *a*-Augen und die entsprechende Veränderung des Fluoreszenzmusters. Die Senkung der Pteridinbildung entspricht dem Grad der Verdunkelung des *a*-Auges.

In *br*-Puppen ist Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin enthalten, und die Kynureninbildung erreicht ihr Maximum bei Beginn der Augenausfärbung und fällt dann wieder ab.

## Literatur

Becker, E.: Über Eigenschaften, Verbreitung und genetisch-entwicklungsphysiologische Bedeutung des Pigments der Ommatin- und Ommingruppe (Ommochrome) bei den Arthropoden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 157 (1942). — Butenandt, A., u. R. Beckmann: Über Ommochrome. VI. Mitt. Zur Genese von Rhodommatin und Ommatin C. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **301**, 116 (1955). — Butenandt, A., E. Biekert u. B. Linzen: Über Ommochrome. XIII. Isolierung und Charakterisierung von Omminen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **312**, 227 (1958). — Über Ommochrome. XIV. Zur Verbreitung der Ommine im Tierreich. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **313**, 251 (1958). — Butenandt, A., u. G. Neubert: Über Ommochrome. V. Mitt. Xanthommatin, ein Augenfarbstoff der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **301**, 109 (1955). — Über Ommochrome. XVII. Zur Konstitution der Ommine, I. Justus Liebigs Ann. Chem. **618**, 167 (1958). — Butenandt, A., U. Schiedt u. E. Biekert: Über Ommochrome. III. Mitt. Synthese des Xanthommatins. Justus Liebigs Ann. Chem. **588**, 106 (1954). — Butenandt, A., U. Schiedt, E. Biekert u. P. Kornmann: Über Ommochrome. I. Mitt. Isolierung von Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin C aus dem Schlupfsekret von *Vanessa urticae*. Justus Liebigs Ann. Chem. **586**, 217 (1954). — Caspari, E.: Über die Wirkung eines pleiotropen Gens bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **130**, 353 (1933). — Genes affecting testis color in *Ephestia kühniella*. Genetics **28**, 286 (1943). — Caspari, E., and I. Blomstrand: The effects of nuclear genes on the structur and differentiation of cytoplasmic particles. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 291 (1956). — Egelhaaf, A.: Der Gehalt an freiem Tryptophan und Kynurenin bei den Genotypen $a^+$ und *a* von *Ephestia kühniella* während der Entwicklung. Z. Naturforsch. **12**b, 465 (1957). — Hadorn, E., u. A. Kühn: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **8**b, 582 (1953). — Kühn, A.: Zur Genetik der helläugigen Mehlmottenstämme. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 136 (1948). — Ein Fluorometer für Papierchromatogramme. Naturwiss. **42**, 529 (1955). — Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwiss. **43**, 25 (1956). — Über eine neue Mutation in der Ommochrombildungskette bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **12**b, 728 (1957). — Kühn, A., u. B. Berg: Zur genetischen Analyse der Mutation *biochemica* von *Ephestia kühniella*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 25 (1955). — Kühn, A., u. A. Egelhaaf: Zur chemischen Polyphänie bei *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **42**, 634 (1955). — Piepho, H.: Über die Temperaturmodifikabilität zweier rotäugiger Rassen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **133**, 495 (1935). — Plagge, E.: Die Pigmentierung der Imaginal- und Raupenaugen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller bei verschiedenen Rassen, Transplantatträgern und Rassenkreuzungen. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **132**, 648 (1935). — Reisener-Glasewald, E.: Über die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella* in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre **87**, 668 (1956). — Viscontini, M., A. Kühn u. A. Egelhaaf: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11**b, 501 (1956).

Prof. Dr. Alfred Kühn, Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen a. N., Spemannstr. 34

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 251—256 (1959)

Aus dem Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien

# DIE GESCHLECHTSVERHÄLTNISSE DER PHORIDE *MEGASELIA SCALARIS* UND DAS PROBLEM EINER ALTERNATIVEN GESCHLECHTSBESTIMMUNG

Von

F. Mainx

*(Eingegangen am 23. April 1959)*

Auf dem X. Internationalen Kongreß für Vererbungsforschung in Montreal hat Ch. Tokunaga (1958) berichtet, daß sie in einigen Substämmen von *Aphiochaeta xanthina* Speis. (Synonym für *Megaselia scalaris* Loew), die aus Köderfängen auf Okinawa abgeleitet waren, Geschlechtsbestimmung nach dem III-Chromosom festgestellt habe, während sonst das I-Chromosom als geschlechtsbestimmendes Chromosomenpaar auftritt und daher in den bisherigen Mitteilungen als X-Y-Paar bezeichnet wurde. Cytologisch läßt sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellen, die Speicheldrüsenchromosomen sind leider für eine Analyse völlig ungeeignet. Nach übereinstimmenden Angaben von Ondraschek (1953) und Tokunaga (1951, 1954) besteht der Chromosomensatz aus zwei Paar V-förmiger und einem Paar stabförmiger Chromosomen, während Barigozzi und Petrella (1953) fünf Paar stabförmiger Chromosomen annehmen. Der Unterschied beruht wohl sicher nicht im Material sondern in der Deutung der cytologischen Bilder. Tokunaga hatte schon früher (1952) mitgeteilt, daß in bestimmten Laboratoriumsstämmen, die nach einem genischen Merkmal selektioniert worden waren, Geschlechtsbestimmung nach dem III-Chromosom festzustellen war, obwohl im Ausgangsmaterial die Geschlechtsbestimmung nach dem I-Chromosom stattgefunden hatte. Sie hat diesen Befund durch die Annahme erklärt, daß durch eine reziproke Translokation ein Abschnitt des ursprünglichen Y-Chromosoms mit einem dominanten, männchenbestimmenden Faktor an das III-Chromosom verlagert worden ist. Je nach der Lagerung dieses Faktors verhalten sich die Gene des III- oder I-Chromosoms im Erbgang als partiell geschlechtsgebunden.

In der an den Bericht in Montreal anschließenden Diskussion hat Ch. Tokunaga mit Recht an der Deutung Kritik geübt, die Springer (1958) seinem Befund gegeben hat, daß die Austauschwerte zwischen dem „Geschlecht" und gewissen Loci des I-Chromosoms sehr verschieden hoch zu sein scheinen, je nachdem durch welchen Stamm man die Markengene in die Kreuzung einführt. Sie wies darauf hin, daß der etwa 50% betragende „Austausch" zwischen dem Geschlecht und den Markengenen einfach als freie Spaltung interpretiert werden kann, wenn man annimmt, daß in dem für die Kreuzung verwendeten *oc*/*oc*-Stamm das Geschlecht nicht nach dem I- sondern nach dem III-Chromosom bestimmt wird. Sie hatte diese Art der Geschlechtsbestimmung in diesem von uns übernommenen Stamm soeben festgestellt. Dieser Befund konnte nach dem Kongreß an unserem Stamm auch voll bestätigt werden. Dadurch und angesichts anderer Befunde von Ch. Tokunaga und uns wird es notwendig, die gesamte bisherige genanalytische

Arbeit mit *Megaselia scalaris* einer neuen, kritischen Betrachtung zu unterziehen. Überdies eröffnen sich durch die Arbeit mit dieser Phoride interessante Aspekte, die von allgemeiner Bedeutung für unsere Auffassungen von der Geschlechtsbestimmung werden können.

Unsere Arbeit begann 1949 mit Stämmen, die einige Zeit vorher aus Köderfängen in Neapel abgeleitet worden waren. Ein „Normal"-Stamm war von zahlreichen gefangenen Pärchen abgeleitet worden. In ihm trat wiederholt das partiell geschlechtsgebundene, rezessive Allel *oc* auf. Es wurden zwei Stämme isoliert: der eine enthält das Allel nur im X-Chromosom, daher zeigen nur die Weibchen das Merkmal, während die Männchen heterozygot sind und normal erscheinen; der andere ist auch im Männchen homozygot in *oc*. Dieser Stamm und der Wildstamm wurden von Ondraschek (1953) verwendet, um den Austausch zwischen dem „Geschlecht" und *oc* im Männchen zu prüfen, natürlich unter der Voraussetzung, daß die Geschlechtsbestimmung nach dem I-Chromosom erfolgt. Der von ihr ermittelte Austauschwert von 1,13 + 0,25% könnte aber auch dadurch vorgetäuscht oder in seiner Größe verändert sein, daß im Wildstamm in geringen Mengen auch geschlechtsbestimmende III-Chromosomen anwesend waren. Das gleiche Bedenken gilt für die viel spätere Wiederholung dieses Versuches durch Springer (1958) und wohl auch für verschiedene Angaben von Tokunaga (1951, 1952) über Austauschwerte zwischen dem Geschlecht und Markengenen des I-Chromosoms. Eine Nachuntersuchung unseres Wildstammes in dieser Beziehung hätte keinen Sinn mehr, da er inzwischen durch Einkreuzung von Linien anderer geographischer Herkunft verändert worden ist.

Eine neue Nachprüfung des Stammes ♀ *oc*/*oc*, ♂ *oc*/+, in dem die Geschlechtsbestimmung sicher vollkommen nach dem I-Chromosom erfolgt, ergab unter 5913 Fliegen nur 4 Ausnahmen, sämtlich Weibchen, die sich als heterozygot für *oc* erwiesen. Da noch kein Ausnahme-Männchen auftrat, ließ es sich noch nicht beweisen, ob diese Ausnahmen durch Austausch zwischen dem Geschlecht und *oc* oder durch Translokation des Geschlechtsdifferentiators an ein Autosom und daraufhin einsetzende freie Spaltung zustande kamen. Da sie im Gesamtversuch einzeln und verstreut auftraten, ist das erstere wahrscheinlicher. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Annahme von Rückmutationen. Eine solche wurde — allerdings in einem viel größeren Zahlenmaterial — einmal in einem homozygoten *oc*/*oc*-Stamm beobachtet. In einem anderen Stamm von ♀ *oc*/*oc*, ♂ *oc*/+, in dem das Geschlecht auch völlig dem I-Chromosom folgt und das III-Chromosom durch *sa*/*sa* markiert ist, traten unter 2264 Fliegen 2 Ausnahmen auf, ein Weibchen und ein Männchen. Dieses Männchen wird im obigen Sinn weiter geprüft. Wenn wir auch annehmen, daß sämtliche Ausnahmen in diesen beiden Versuchen durch Austausch zwischen dem Geschlecht und *oc* zustande gekommen sind und die Ergebnisse zusammenfassen, so ergibt sich erst ein Austauschwert von 0,07%, der trotz der mangelhaften statistischen Sicherung schon signifikant von 1,13% verschieden ist. Es ist wohl anzunehmen, daß dieser hohe Austauschwert bei den früheren Untersuchungen z.T. durch die Anwesenheit von geschlechtsbestimmenden III-Chromosomen im Wildstamm vorgetäuscht worden ist. Vielleicht läßt sich auch die ältere Angabe von Gilchrist und Haldane (1947) über Austausch zwischen dem Geschlecht und einem partiell geschlechtsgebundenen Locus bei *Culex molestus* so deuten.

Für den Austauschwert von 2,92 ± 0,68% zwischen *Ab* und dem Geschlecht im I-Chromosom bei SPRINGER (l. c.) gilt der gleiche Einwand. Hier konnte allerdings festgestellt werden, daß der zu den Versuchen verwendete *Ab*/+-Stamm, wenigstens in seiner Masse, jetzt nach dem I-Chromosom im Geschlecht bestimmt ist. Es gilt also wohl im geschlechtsbestimmenden I-Chromosom (früher „Y-Chromosom") die Reihenfolge „Geschlecht" — *oc* — *Ab*, wenn man die Lage des Geschlechtsdifferentiators terminal annimmt, was nach dem folgenden wohl sicher ist.

Besonders merkwürdig ist das Verhalten des oben erwähnten *oc*/*oc*-Stammes. ONDRASCHEK (l. c.) hat in der $F_2$-Generation der Kreuzung Wild-♀ × *oc*/*oc*-♂ unter 1034 Tieren nur 2 Ausnahme-Weibchen gefunden, die sie als das Ergebnis des Austausches zwischen *oc* und dem Geschlecht im Männchen der $F_1$ deutet, die allerdings auch als das Ergebnis einer geringen Beimengung von geschlechtsbestimmenden III-Chromosomen im *oc*/*oc*-Stamm gedeutet werden können, wie sie oben für den Wildstamm schon sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte. Jedenfalls war im *oc*/*oc*-Stamm damals das Geschlecht zumindest vorwiegend nach dem I-Chromosom bestimmt. Dies ist auch ein Beweis dafür, daß das Allel *oc* im geschlechtsbestimmenden I-Chromosom (bisher „Y-Chromosom") anwesend sein kann und dort die gewöhnliche Wirkung ausübt. Heute folgt die Geschlechtsbestimmung in dem gleichen Stamm, wie schon erwähnt, ausschließlich oder doch stark vorwiegend dem III-Chromosom. Es wurden 6 Versuche mit je etwa 20 Männchen des Stammes durchgeführt, wobei sich ausschließlich die Geschlechtsbestimmung nach dem III-Chromosom ergab. Es muß also in dem Zeitraum von etwa 1950—1956 in diesem Stamm eine wesentliche Veränderung vorgegangen sein. Am wahrscheinlichsten ist wohl die Annahme, daß der Stamm schon damals geschlechtsbestimmende III-Chromosomen in geringer Zahl enthalten hat und daß diese jetzt die überwiegende Hauptmasse des Stammes darstellen, während die geschlechtsbestimmenden I-Chromosomen ganz oder fast ganz aus ihm verschwunden sind. Dies könnte auf rein statistischem Wege geschehen sein, da bei *Megaselia* in Massenkultur häufig einer größeren Zahl von unfruchtbaren Individuen einige sehr fruchtbare gegenüberstehen, durch die die Kultur weitergeführt wird. Gerade bei der Haltung dieses Stammes gab es einige „Engpässe", die der Stamm nur durch die Fruchtbarkeit weniger Pärchen überwunden hat. Es könnte aber auch sein, daß ein selektives Moment zum allmählichen Verschwinden der geschlechtsbestimmenden I-Chromosomen aus dem Stamm geführt hat. Ähnliche Erfahrungen von TOKUNAGA (l. c.) könnten im gleichen Sinn gedeutet werden. Um sicherzugehen, wurden jetzt von unseren Zuchtstämmen 1-Männchen-Linien abgeleitet, deren Geschlechtsbestimmungsmodus geprüft wird. Künftig sollen alle Versuche nur mehr mit solchen Linien durchgeführt werden, deren Geschlechtsbestimmung ständig kontrolliert werden soll.

Es ergibt sich nun die Frage, inwieweit angesichts der geschilderten Umstände die Schlüsse berechtigt sind, die SPRINGER (l. c.) aus seinen Versuchszahlen auf die Koppelungsverhältnisse im weiblichen und männlichen Geschlecht von *Megaselia scalaris* gezogen hat. Die Austauschwerte zwischen *y* und *sa* im III-Chromosom von 31,07 + 1,37% für das Weibchen und von 0,205 + 0,072% für das Männchen sind zutreffend, wobei die Geschlechtsbestimmung in den zu diesen Kreuzungen verwendeten Stämmen, zumindest fast vollkommen, nach

dem I-Chromosom erfolgte. Der Austauschwert von 10,61 ± 0,38% zwischen *Ab* und *oc* im I-Chromosom des Weibchens ist ebenfalls korrekt. Die beiden Versuche zur Ermittlung dieses Austauschwertes im Männchen sind jedoch insofern anders zu deuten, als die Geschlechtsbestimmung infolge der Verwendung des *oc*/*oc*-Stammes in diesen Versuchen nach dem III-Chromosom erfolgte. Sie sind daher nicht als Dreipunktversuche zwischen *Ab*, *oc* und dem Geschlecht zu werten. Für die Ermittlung des Austauschwertes zwischen *Ab* und *oc* sind sie brauchbar, doch muß dieser Wert nun neu berechnet werden und ergibt 1,87 ± 0,25%. Dieser Austauschwert zwischen *Ab* und *oc* im Männchen gilt außerdem nur für gleichzeitige Geschlechtsbestimmung durch das III-Chromosom. Die allgemeinen Schlußfolgerungen des Autors über die verschiedene Größe des Austausches im weiblichen und männlichen Geschlecht bestehen also weiterhin zurecht. Dagegen wird seine Hypothese von einem C-Faktor im Y-Chromosom, vermutlich einer Inversion, hinfällig.

Um die Koppelungsverhältnisse zwischen den Loci *y* und *sa* des III-Chromosoms und dem Geschlechtsdifferentiator an diesem Chromosom zu prüfen, wurde mehrfach die Kreuzung *y sa*/*y sa*-♀ × *oc*/*oc*-♂ angesetzt, also unter Verwendung des *oc*/*oc*-Stammes, in dem die Geschlechtsbestimmung dem III-Chromosom folgt. Die phänotypisch normalen Männchen der $F_1$ wurden mit *y sa*/*y sa* rückgekreuzt. Bei Erhaltung der Koppelung ergeben sich weiterhin nur *y sa*/*y sa*-Weibchen und phänotypisch normale *y sa*/ + +-Männchen, wobei die Anwesenheit des Allels *oc* in den Folgegenerationen vernachlässigt wurde. Der Einfachheit wegen wurde bei Fortführung des Versuches die Kreuzung nicht neu angesetzt, sondern die Tiere mit Erhaltung der Koppelung wurden nach Kontrolle zur Weiterzucht verwendet. Bei einer Gesamtzahl von 3112 Fliegen wurden im ganzen 11 Ausnahmen gefunden, 6 Weibchen und 5 Männchen. Von diesen trat ein normales Weibchen isoliert auf, 5 normale Weibchen und 5 *y sa*/*y sa*-Männchen dagegen in einer Gruppe in zwei aufeinanderfolgenden, ziemlich individuenarmen Generationen einer Linie des Versuches. Vier Weibchen konnten untersucht werden und erwiesen sich als heterozygot in *y sa*. Von den Männchen konnte nur eines durch Rückkreuzung seiner doppelt heterozygoten Söhne mit *y sa*/*y sa*-Weibchen analysiert werden. Es ergab sich, daß hier freie Spaltung zwischen der Allelgruppe *y sa* und dem Geschlecht vorliegt. Diese Ausnahme war also nicht durch Austausch zwischen dem Geschlechtsdifferentiator und *y sa* zustande gekommen sondern durch Translokation des Geschlechtsdifferentiators vom III-Chromosom. Ob diese Translokation wirklich an das I-Chromosom erfolgt ist, wird noch untersucht. Das gehäufte Auftreten der 10 Ausnahmetiere in einer Linie spricht dafür, daß der Translokationsvorgang nur einmal und schon eine Generation vorher eingetreten ist. Er führt ja neben den erkennbaren Ausnahmen auch mit 50% Erwartung zu nicht erkennbaren Typen, deren Nachkommen die gehäuft erschienenen Ausnahmen sein dürften. Ob das isoliert von dieser Gruppe aufgetretene Ausnahmeweibchen auf eine Translokation oder auf einen Austausch zurückgeht, kann nicht entschieden werden.

Damit ist es erstmalig erwiesen, daß es den von Tokunaga (l. c.) zur Erklärung der merkwürdigen Phänomene einer zwischen dem I- und dem III-Chromosom wechselnden Geschlechtsbestimmung angenommenen Translokationsvorgang wirklich gibt. Wenn wir annehmen, daß er in dem genannten Versuch

nur einmal eingetreten ist, so ergibt sich für ihn eine Erwartung von mindestens 0,03%, eine für einen bestimmten Translokationsvorgang sehr hohe Frequenz. Es müßte also angenommen werden, daß der Translokationsvorgang, durch den der Geschlechtsdifferentiator zwischen dem III-Chromosom und dem I-Chromosom ausgetauscht werden kann, ein bevorzugter Vorgang ist.

In dem oben genannten Versuch traten unter einer Zahl von 3112 Fliegen keine Ausnahmen auf, die nachweisbar auf einen Austausch zwischen *y* und *sa* zurückgehen. Bei Geschlechtsbestimmung nach dem III-Chromosom wäre also der Austauschwert zwischen *y* und *sa* im Männchen im Umfang dieses Versuches gleich Null. Die geringe statistische Sicherung läßt noch keine Aussage darüber zu, ob der Unterschied zwischen diesem Wert und dem von SPRINGER (s. oben!) angegebenen Wert von 0,205% für den Austausch zwischen *y* und *sa* bei Geschlechtsbestimmung durch das I-Chromosom beweisend ist. Immerhin liegt hier ein Hinweis vor, daß die alternative Anwesenheit des Geschlechtsdifferentiators am I- oder am III-Chromosom die Koppelungsverhältnisse in diesen Chromosomen oder etwa im ganzen Chromosomensatz des Männchens verändern könnte. Damit ist eine weitere Richtung unserer Untersuchungen vorgezeichnet. Ebenso wäre die Angabe von TOKUNAGA (l. c.) weiter zu prüfen, daß bei Anwesenheit des Geschlechtsdifferentiators am III-Chromosom die letale oder subletale Wirkung von Allelen im I-Chromosom aufgehoben sei. Beide Beobachtungen lassen interessante Positionseffekterscheinungen vermuten.

Über die hier vorliegenden cytogenetischen und genphysiologischen Probleme hinaus erscheinen uns aber die bisherigen Beobachtungen über die Geschlechtsbestimmung von *Megaselia scalaris* noch von größerer allgemeiner Bedeutung zu sein. W. BEERMANN (1953, 1955a) hat in sorgfältigen Untersuchungen nachgewiesen, daß bei *Chironomus tentans* und *C. pallidivittatus* abwechselnd das I- oder das II-Chromosom Träger des Geschlechtsdifferentiators sein kann und daß beide Sorten von Männchen in der Natur nebeneinander vorkommen. Er hat (1955b) die große Bedeutung dieser Erscheinung für unsere Auffassungen von der Geschlechtsbestimmung und von der phylogenetischen Entwicklung der geschlechtsbestimmenden Mechanismen erörtert. Sein Nachweis stützt sich auf die Feststellung von typischen Inversionskomplexen, die den geschlechtsbestimmenden Arm des I-, bzw. des II-Chromosoms markieren. Hier bei *Megaselia* ist dieser Nachweis auf genanalytischer Basis erbracht worden. Auch hier kommen beide Sorten von Männchen in der Natur vor. Der Übergang von der einen Männchensorte zur anderen durch reziproke Translokationen eines terminalen Abschnitts ist von BEERMANN (1955b) theoretisch vermutet, von TOKUNAGA als wahrscheinlich angenommen und hier für einen Fall erwiesen worden. Die von BEERMANN zuerst für Chironomiden nachgewiesene Erscheinung eines unisexuellen, cytogenetischen Polymorphismus liegt also auch bei einer Phoride vor und dürfte demnach eine verbreitete Erscheinung im Reiche der Dipteren sein. Man kann wohl annehmen, daß ein adaptives Moment an der Aufrechterhaltung dieses Polymorphismus in der Population beteiligt ist. Positionseffektwirkungen wären als Grundlage eines adaptiven Gleichgewichts vorstellbar. In unserem Institut wurden Versuche begonnen, in denen in Populationskästen die beiden Männchensorten ohne und mit Belastung der betreffenden Chromosomen durch vitalitätsmindernde Allele, bzw. unter verschiedenen Außenbedingungen in

Konkurrenz gesetzt werden, um die Frage der Einstellung eines adaptiven Gleichgewichts zu prüfen. Außerdem sollen quantitative Analysen natürlicher Populationen durchgeführt werden. Zum Vergleich sollen die Geschlechtsverhältnisse bei anderen kultivierbaren Phoriden geprüft werden.

## Literatur

Barigozzi, C., and L. Petrella: Number and behaviour of chromosomes in *Aphiochaeta xanthina* Speiser. Experientia (Basel) **9**, 337 (1953). — Beermann, W.: Chromosomenpolymorphismus und Bastardierung zweier *Chironomus*-Arten. Zool. Anz. Suppl. **17**, 290—295 (1953). — Cytologische Analyse eines *Camptochironomus*-Artbastards. I. Kreuzungsergebnisse und Evolution des Karyotypus. Chromosoma (Berl.) **7**, 198—259 (1955a). — Geschlechtsbestimmung und Evolution der genetischen Y-Chromosomen bei *Chironomus*. Biol. Zbl. **74**, 525—544 (1955b). — Gilchrist, B.M., and J.B.S. Haldane: Sex linkage and sex determination in a Mosquito, *Culex molestus*. Hereditas (Lund) **33**, 175—190 (1947). — Ondraschek, H.: Vererbungsstudien an *Aphiochaeta xanthina* Speis. *(Phoridae)*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 347—353 (1953). — Springer, R.: Die Koppelungsverhältnisse bei den beiden Geschlechtern von *Megaselia scalaris* Loew (= *Aphiochaeta xanthina* Speis.) *(Phoridae)*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 373—376 (1958). — Tokunaga, Ch.: Genetic studies on *Aphiochaeta sp.* I—IV. Jap. J. Genet. Suppl. **2**, 69—74 (1949); **24**, 128—138 (1950); **26**, 31—40, 119—124, 125—128 (1951); **27**, 38—47, 100—106 (1952). — Die Cytologie von *Aphiochaeta xanthina* Speis. [Japanisch]. Zeitschrift unbekannt. 1954. — The Y-chromosome in sex determination of *Aphiochaeta xanthina* Speiser. Proc X. Intern. Congr. Genetics **2**, 295—296 (1958).

Prof. Dr. F. Mainx, Institut für Allgemeine Biologie der Universität, Wien IX (Österreich), Schwarzspanierstraße 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 257—262 (1959)

From the Department of Biology, Fordham University, New York City

# THE INFLUENCE OF DEPRESSION OF RESPIRATORY METABOLISM BY CARBON MONOXIDE ON THE PIGMENT DEVELOPMENT IN THE INSECT EYE

By

Sister Mary Christopher Rohner, S.N.D.

With 1 coloured Figure in the Text

*(Received April 20, 1959)*

## Introduction

The use of carbon monoxide to inhibit the cytochrome system in respiratory processes, and the light reversibility of this inhibition (cf. Warburg 1928) has had extensive application in physiological-biochemical investigations. The technique has great value also as a tool in experimental embryology because the depression of respiratory metabolism by carbon monoxide causes, in some cases, stoppage of cell divisions (Runnström 1930) and subsequent developmental aberrations, which can be then explained in terms of a well-analyzed physiological process (Wolsky 1937). In view of the prominence given to the insect eye in developmental physiology and genetics it was decided to apply this technique to a study of the connections between respiratory metabolism and developmental processes of this organ during metamorphosis. This paper deals with one aspect of the study, the effect of the treatment on pigment development in the eyes and it is intended to be a contribution to the knowledge of the metabolic basis of eye pigment formation in insects, a problem to which both geneticists and biochemists have devoted their attention.

## Material and Methods

The two insects, chosen for the study were *Drosophila melanogaster* Meigen of an Oregon-R inbred wild stock, and *Mormoniella vitripennis* Walker, a parasitic chalcid wasp, introduced recently by Whiting (1951, 1955) as an experimental material for studies in genetics, also of the wild type stock, supplied by the Carolina Supply Company, Elon College, North Carolina. The cultures of both insects were bred at constant temperatures of 18° C and 25° C. The *Drosophila* cultures were kept on the standard cornmeal-molasses medium, *Mormoniella* lived on live pupae of *Sarcophaga bullata,* also obtained from Carolina Supply Company and used according to Whiting's prescriptions. Pupae of both species were selected for tests immediately after pupation and in most cases were kept in the carbon monoxide containing atmosphere for the whole pupal period.

The carbon monoxide-oxygen mixtures were prepared in 9:1 ratio from commercially supplied gases, collected in graduated gas burettes after passing through 10 per cent potassium hydroxide. The burettes were sealed with a saturated sodium chloride solution, which in addition to having the same coefficient of absorption for oxygen and carbon monoxide, maintained a constant relative humidity of 75 per cent in the gaseous atmosphere above it.

The pupae to be exposed to the gas mixture were placed in Carrell flasks, the gases blown through for a few seconds, after which the flasks were tightly stoppered by rubber stoppers. The burettes, containing the $CO-O_2$ mixture remained connected with the Carrell flasks throughout the experiments to compensate for any loss of the gas mixture due to an

eventual seeping through the stoppers or rubber tubing. In the final set-up, the sodium chloride solution thus exerts a certain back pressure on the gas surrounding the pupae. By closing the entire apparatus inside an incubator, total darkness was obtained; when illumination was desired, it was provided by a small microscope lamp with condenser placed inside the incubator and focused on the Carrel flask.

In one series, the pupae under carbon monoxide poisoning were given either complete illumination or complete darkness. In another series a single pupal body in the carbon monoxide containing atmosphere was subjected to unilateral illumination, one side of it being protected against light either by a small screen made of black paper (the kind used to pack photographic plates) or, in the *Drosophila* experiments, by painting one half of the pupal case with a quick drying black varnish. Air controls of all types of treatment were observed simultaneously.

## Results

The choice of two insects was made with the tentative assumption that the results with the one organism would more or less confirm those obtained with the other. As far as the effect on the rate of pigment development (and development in general) is concerned, this confirmation was obtained. The process of development and differentiation was generally slowed down both in *Drosophila* and *Mormoniella* to the same extent in the carbon monoxide containing atmosphere.

Table 1. *Drosophila melanogaster. Duration of metamorphosis in days at 25° C in air and in carbon monoxide containing atmosphere*

| Stage | Air | $CO/O_2$ (9:1) in light | $CO/O_2$ (9:1) in dark |
|---|---|---|---|
| Puparium formation . | 0 | 0 | 0 |
| Imaginal body | 1 | 1 | 1 |
| Yellow eye. . | 2 | 3 | 4 |
| Brown eye . . | 3 | 4 | 5 |
| Red eye . . . | 4 | 6 | 7 |
| Emergence. . | 5 | — | — |

Prepupae of *Drosophila*, taken at the stage when the tracheal trunks were still intact, have developed in air at 25° C through the successive eye color stages and were ready to emerge on the fifth day. In carbon monoxide-oxygen mixture, exposed to light, the same stages were reached somewhat later and the final red pigmentation of the eye (as well as the blackening of the bristles and wings) was not completed until the sixth day. The same treatment, in the absence of light, delayed pigment development for another 24 hours (Table 1). At 18° C the development was considerably slower both in air and in the carbon monoxideoxygen mixture than at 25° C under the same conditions.

It must be mentioned that in the carbon monoxide-oxygen mixture development was arrested at the end of metamorphosis and the flies, though seemingly ready to emerge from the puparium, have hardly ever done so. There were only five or six among the several hundreds treated, which could actually leave the puparium. Experiments with different length of exposure to the carbon monoxide containing atmosphere have shown that if the treatment was shorter than 24 hours the pupae survived and imagos have emerged, but a longer treatment resulted in blocking the emergence, even though the metamorphosis went on until completed. The flies, which did not emerge, have eventually died in the puparium, even if they were transferred to air or oxygen at the completion of metamorphosis.

In *Mormoniella* the best way to observe the progress of metamorphosis is to follow the development of body pigmentation. (The adult wasp has deep black body color with a greenish metallic hue. The pigmentation starts in the

metathoracal region and spreads from there first in anterior direction. The abdomen becomes pigmented only after the thorax and head are completely black, cf. FERSCHL and WOLSKY 1956.) Prepupae of *Mormoniella*, taken at the time when the pupal body changes from pure white to an amber color, when kept in air at 25° C, were fully pigmented in six days. In carbon monoxide-oxygen mixture in light the same stages were completed in about eight days, while the same treatment in dark resulted in the completion of metamorphosis in over ten days (Table 2). Again, the cases of successful emergence were very few when carbon monoxide treatment was applied for more than 24 hours. Most of the pupae, treated for over 24 hours could loosen their wings, antennae and legs, but only one or two have ever freed themselves completely of the pupal skin; in such cases they lived only six to ten hours.

Table 2. *Mormoniella vitripennis. Duration of metamorphosis in days at 25° C in air and in carbon monoxide containing atmosphere*

| Stage | Air | $CO/O_2$ (9:1) in light | $CO/O_2$ (9:1) in dark |
|---|---|---|---|
| White pupa . | 0 | 0 | 0 |
| Amber pupa . | 1 | 1 | 1 |
| Eye color . . | 2—3 | 2—5 | 2—7 |
| Thorax blackening | 4—5 | 6—7 | 8—9 |
| Abdomen blackening . | 6 | 8 | 10 |
| Emergence . . | 7 | — | — |

In contrast to this identity of results concerning the rate of development in carbon monoxide containing atmosphere, there was a striking difference in the qualitative effects of the treatment specifically on the development of the eye pigments. Whereas in *Drosophila* the quality of eye pigments was not altered by the carbon monoxide treatment, in *Mormoniella* the eye pigments, as formed in carbon monoxide containing atmosphere, differed sharply from the products of the normal process. In *Drosophila* the eye colors develop successively, both in air and in the carbon monoxide-oxygen mixture from pale yellow, to chrome yellow, to ochre, to brown and finally to red. With *Mormoniella*, however, the situation is quite different. The eye color in air begins as a bright blood red, then turns to a brown red, and ends as a dark chocolate brown. Neither this sequence, nor comparable hues develop in the carbon monoxide treated pupae. The initial bright red persists throughout metamorphosis and is retained as long as the pupae remain alive in the carbon monoxide containing atmosphere. While in normal development the darkening of the eyes precedes darkening of the body and the eye is already deep chocolate brown at the time when both head and abdomen are still amber colored, in the carbon monoxide-oxygen atmosphere the eye is still bright red when the body pigmentation is completed. Since this appearance strongly resembles the phenotype of some eye color mutants of the species, described by WHITING (1951, cf. also KAYHART 1956), the production of this appearance by a well-controlled external influence is to be considered as a case of phenocopy. The eye colors were matched to plates of a detailed color chart (MAERZ and PAUL 1950) and the following near approximations were found: Wild type: Plate 8, Column L, 6—10 (nearest to "Brazil Brown"); mutant "red": Plate 4, Column L, 9—12 (nearest to "Holly Berry[1]"); phenocopy: Plate 5,

[1] KAYHART (1956) compared several "red" mutant alleles of the R locus of *Mormoniella* with the MAERZ and PAUL color charts and found the eye color of one of these mutants near to Plate 4, Column K, 10—12, i.e. near to our determination.

Column L, 5—6 (nearest to "Cardinal"). The striking eye color difference between the normal and the carbon monoxide treated pupae is clearly shown in Fig. 1, based on color chart matchings.

It should be mentioned that the pigments do not appear simultaneously in the entire eye anlage either in *Drosophila* or in *Mormoniella*, but formation

Fig. 1. *Mormoniella vitripennis.* Free hand sketches of comparable stages of pupal development in air (upper row) and in a 9:1 carbon monoxide-oxygen atmosphere (lower row). Colors are carefully matched to living specimens. The successive stages are reached faster in air than in carbon monoxide, but otherwise they are alike, except eye color, which remains red permanently in carbon monoxide, but turns brown in air even before the blackening of the thorax

begins in the postero-dorsal region, from where it advances in a generally antero-ventral direction. This tendency of the spread of pigmentation, or "stream of differentiation" was observed before in many instances in insect eyes (cf. WOLSKY 1949, 1956, BURKE 1956) and the present observations confirm that it also exists both in *Drosophila* and *Mormoniella*. The spread of pigment formation in an antero-ventral direction is not affected by the carbon monoxide treatment, only its rate, which is, of course, reduced, together with the general slowing of the rate of development.

## Discussion

The results described here point up some hitherto unknown facts concerning the chemistry and physiology of the eye pigments of insects. These pigments, and their genic control are known in many details and there is reason to believe that they all belong to two main categories of substances: ommochromes, which are, as a rule yellowish brown or nearly black in color and derive from tryptophane, via kynurenin (cf. Butenandt 1953), and pterin derivates, which occur usually in different hues of pink or red and are still under a thorough physiological and biochemical investigation (cf. Hadorn 1956, 1959). In the insect eyes, in which pigment formation was studied in greater detail, like *Drosophila* or *Ephestia*, both ommochrome and pterine pigments are present and this seems to be true also for *Mormoniella*, as far as one can judge from the occurrence and behavior of eye color mutants. But inspite of this apparent similarity in eye pigments there is a sharp difference between *Drosophila* and *Mormoniella* as regards the pigment production in the eyes under the influence of carbon monoxide. In *Drosophila* this gas does not interfere with the sequence of appearance, or with the color of either pigment components in the eye. In *Mormoniella* it suppresses the formation of the brown (ommochrome ?) pigment, leaving the red one (pterine derivate ?), as well as the black integumental pigment unaffected. This points to a sharp difference in the biochemical reactions leading to ommochrome formation in the two insects. What is the explanation of these phenomena ?

The effect of carbon monoxide on living organisms, especially if it is light reversible, is considered to be due to an inhibition of the iron containing porphyrin component of the enzymes of the cytochrome system. Although there are a few other enzymes, which are also sensitive to carbon monoxide, there is no indication that in any of the enzymes, involved directly in pigment formation (including tyrosinase) the carbon monoxide inhibition would show a similar light reversibility. It is therefore safe to conclude that the suppression of ommochrome formation by carbon monoxide in the eyes of *Mormoniella* is probably an indirect effect, due to some coupling of the pigment producing reactions to the activities of the cytochrome system. Not long ago such a conclusion would have sounded very strange, but in recent years it was shown by several groups of investigators that certain polyphenol products of intermediate metabolism (quinones) play a role both in ommochrome formation (Butenandt, Biekert and Linzen 1956, Glass 1957) and in oxydative metabolism (Karlson and Wecker 1955, Martius 1954). Thus the basis is established for a formal explanation of the phenomena observed, though much remains to be clarified and the details of this problem must be discussed outside the frame of this paper. It seems that in *Mormoniella* there is an oxydation-reduction reaction somewhere in the chain of biochemical processes, which is common both for respiratory metabolism and ommochrome formation and if respiration is inhibited (at the level of the cytochrome system) this affects pigment production as well. This common link, however, does not seem to exist in *Drosophila* (and possibly in other insects) or it can continue its role in ommochrome formation even when the cytochrome system is inhibited. In any case it must be concluded that in *Mormoniella* the biochemical processes leading to the formation of the brown-black (ommochrome ?) pigment in the

eyes are closely linked to processes of oxydative metabolism, whereas in *Drosophila* the two sets of processes are independent from each other.

## Summary

1. Keeping pupae of *Drosophila melanogaster* and *Mormoniella vitripennis* in carbon monoxide containing atmosphere ($CO/O_2$ in the ratio of 9:1) produces a general retardation of developmental processes, including the development of eye pigments. The retardation is greater and the development more sensitive to such treatment in *Mormoniella* than in *Drosophila*.

2. In addition to the quantitative effects the carbon monoxide treatment has also a specific qualitative effect on the development of the brown-black pigment (ommochrome ?) in the eyes of *Mormoniella*, which is completely suppressed, while in *Drosophila* the corresponding pigment component is not affected.

3. It is concluded that in *Mormoniella* a coupling exists between processes of respiration and ommochrome formation, which is missing or is not essential in *Drosophila*. A possible explanation of this coupling is suggested.

*Acknowledgments.* The author wishes to express her gratitude to Dr. Alexander Wolsky, Professor of Experimental Embryology at Fordham University, under whose guidance this research was done.

The work was supported in part by a Fellowship from the U.S. National Science Foundation.

This paper is based on a thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of Biology of Fordham University.

## References

Butenandt, A.: Biochemie der Gene und Genwirkungen. Naturwiss. **40**, 91 (1953). — Butenandt, A., B. Biekert and B. Linzen: Über Ommochrome. VII. Modellversuche zur Bildung des Xanthomatins in vivo. Hoppe-Seylers Z. **305**, 284 (1956). — Burke, J.: Differentiation of the compound eyes of *Doleschallia bisaltida* Cramer. Anat. Rec. **125**, 619 (1956). — Ferschl, Sr. J. M. B., and A. Wolsky: Observations on the pigment development in pupae of *Mormoniella vitripennis*. Anat. Rec. **125**, 599 (1956). — Glass, B.: In pursuit of a gene. Science **126**, 683 (1957). — Hadorn, E.: Patterns of biochemical and developmental pleiotropy. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. **21**, 363 (1956). — Contributions to the physiological and biochemical genetics of pteridines and pigments in insects. Proc. 10. Internat. Congr. Genetics. In press 1959. — Karlson, P., and E. Wecker: Die Tyrosinaseaktivität während der Puppariumbildung von *Calliphora erythrocephala*. Hoppe-Seylers Z. **300**, 42 (1955). — Kayhart, M.: A comparative study of dose-action curves for visible eye-color mutations induced by X-rays, thermal neutrons and fast neutrons in *Mormoniella vitripennis*. Radiat. Res. **4**, 65 (1956). — Maerz, A., and M. R. Paul: A dictionary of color, 2. edit. New York: McGraw-Hill Book Comp. 1950. — Martius, C.: Die Stellung des Phyllochinons (Vitamin K) in der Atmungskette. Biochem. Z. **326**, 26 (1954). — Runnström, J.: Atmungsmechanismus und Entwicklungserregung bei dem Seeigelkeim. Protoplasma **10**, 106 (1930). — Warburg, O.: Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin: Springer 1928. — Whiting, P. W.: Multiple complementary alleles in *Habrobracon* and *Mormoniella*. J. Genet. **50**, 206 (1951). — Some interactions of mutant eye-color factors in the wasp *Mormoniella vitripennis*. Pennsylvania Acad. Sci. **29**, 242 (1955). — Wolsky, A.: Production of local depression in the development of *Drosophila* pupae. Nature (Lond.) **139**, 1069 (1937). — The growth and differentiation of retinular cells in the compound eyes of the silkworm (*Bombyx mori* L.). Proc. 6. Internat. Congr. Exper. Cytol. Exp. Cell Res. Suppl. **1**, 549 (1949). — The analysis of eye development in insects. Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II **18**, 592 (1956).

Sister Mary Christopher Rohner, S.N.D.,
Notre Dame College, Cleveland 21, Ohio, USA

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 263—272 (1959)

Department of Biology Wesleyan University* Middletown, Conn.

# ON A MODIFIER OF THE GENE *a* IN *EPHESTIA KÜHNIELLA*

By

ERNST CASPARI and FREDERICK J. GOTTLIEB

With 8 Figures in the Text

*(Received April 20, 1959)*

## Introduction

In *Ephestia*, three spontaneous mutations to light eye color have been described: *a* (KÜHN and HENKE 1930), *wa* (KÜHN and SCHWARTZ 1942) and *br* (KÜHN 1957). In 1955, Drs. D. S. GROSCH and R. L. SULLIVAN at North Carolina State College, Raleigh, N.C. observed the appearance of red eyed individuals in their wild type *Ephestia* cultures which were used as food for *Habrobracon*. Drs. GROSCH and SULLIVAN were kind enough to send us material from their cultures from which a true breeding red eyed strain could be extracted. The present report deals with the genetic behavior of this red eyed mutant.

## Strains and Culture Methods

The moths used in this investigation were obtained from single cultures which were raised in rectangular plastic refrigerator jars, $7 \times 7 \times 13$ cm, or in round glass finger bowls, 10 cm in diameter. They were fed on yellow granulated cornmeal and kept in a constant temperature room at $25 \pm 1^0$ C. The following strains were used:

1. R1. A red eyed *aa* strain derived from the original mutation described by KÜHN and HENKE (1930). It had been originally selected for red color and was used as the light *aa* strain by CASPARI (1933) and by PIEPHO (1935). It had been continued by brother-sister mating and was light red at the time of this investigation.

2. NC. The red eyed strain extracted from the material obtained from Raleigh, N.C. The strain had originally a darker eye color than R1 and was selected for three generations for dark red eye color. Afterwards it was continued by brother-sister mating without selection. The eye color was dark red to coffee-brown, resembling that due to the allele $a^K$ (PIEPHO 1935).

3. BII. A wild type ($a^+a^+$) strain obtained in 1938 from Dr. P. W. WHITING, homozygous for *Rt*, inbred for close to 100 generations.

## Measurement of Eye Colors

Every day the eye colors of the freshly hatched animals were determined by comparison with the color charts of the "Color Harmony Manual — 3rd Edition" manufactured by the Container Corporation of America. These charts are based on OSTWALD's Farbkörper used in previous investigations (CASPARI 1933), employing recently developed pigments. The method used in identifying the colors is the same as that employed previously.

In this way, the color is identified by hue, as indicated by the number of the color table, and by grey content and brightness, as indicated by the coordinates on the table. PIEPHO (1935) has demonstrated a strong positive correlation between hue and brightness, though this correlation is not linear throughout

* This investigation was aided by Grant G-4495 of the U.S. National Science Foundation.

the range (KÜHN 1948). The distributions of the two strains R 1 and NC for these three measurements are given in Figs. 1—3. In all these measurements, the strains show decided differences, and these differences are highly significant. [For hue: $M(R1) = 4.022 \pm 0.033$, $M(NC) = 5.000 \pm 0.009$; for brightness: $M(R1) = 7.953 \pm 0.018$, $M(NC) = 9.601 \pm 0.021$; for grey content: $M(R1) = 5.930 \pm 0.022$, $M(NC) = 5.293 \pm 0.093$.] Because of the

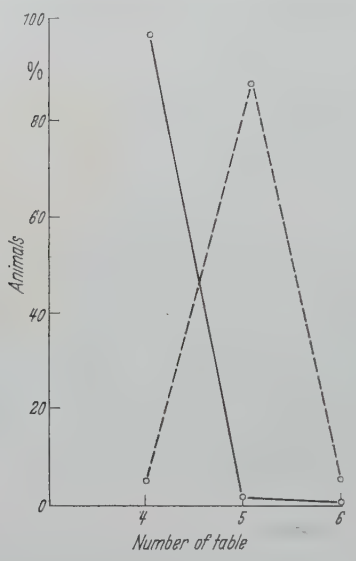



Fig. 1

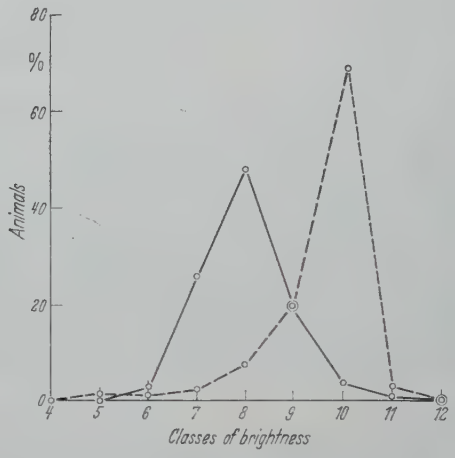



Fig. 2

Fig. 1. Distribution of values for eye color hue in strains NC (n = 1460) and R 1 (n = 2257). o ——— o R 1; o — — — o NC

Fig. 2. Distribution of values for eye color brightness in strains NC (n = 1460) and R 1 (n = 2257). o ——— o R 1; o — — — o NC

large number of classes, the relatively low amount of overlapping between the curves for the two strains, and the normal shape of the curves, brightness seems to be the most sensitive of these measures, and has accordingly been used in all previous investigations.

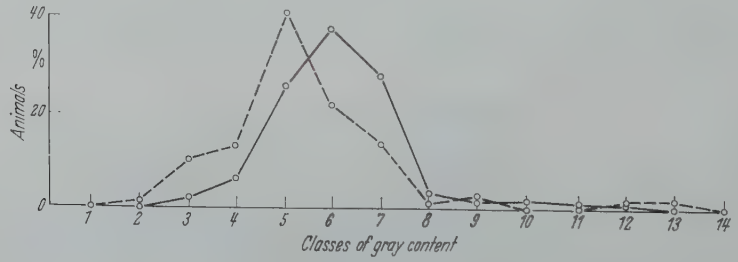



Fig. 3. Distribution of values for gray content of eye colors in strains NC (n = 1460) and R 1 (n = 2257). o ——— o R 1; o — — — o NC

For the present investigation, another measure was used, reflectance. An explanatory text accompanying the "Color Harmony Manual" (JACOBSON, GRANVILLE and FOSS 1948) supplies tables of reflectance values, expressed as percent reflectance, for all fields of the Color Manual. The reflectance values for colors situated inbetween the fields were interpolated. Since the reflectance

value is a composite of hue, brightness and grey content, and since it seems more closely related to the amount of pigment, the actual variable investigated, percent reflectance seemed most appropriate as a measurement of color in the following analyses. The distributions of reflectance values for strains R1 and NC are represented in Figs. 4 and 5. The two strains overlap less than for any other measurement except hue, and the difference between the means of the two strains is highly significant [M(R1) = 30.620 ± 0.089, M(NC) = 18.692 ± 0.108]. In both strains and in the crosses discussed below, the values for males and females were evaluated separately. But since no differences were found (Fig. 4), they are pooled in the data presented.

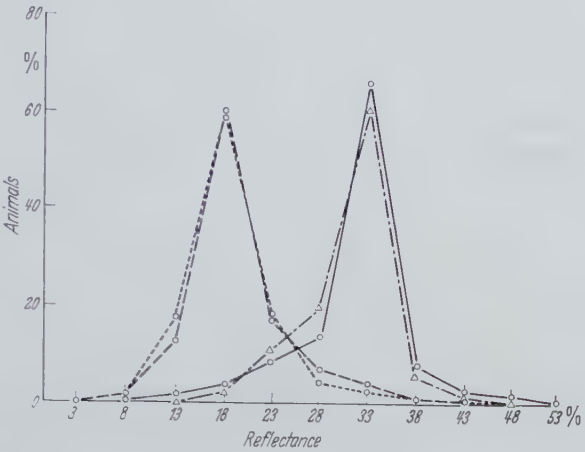



Fig. 4. Distribution of values for reflectance of eye colors in strains NC and R1, by sexes. o———o R1 ♀ (n = 1102); △—·—·—△ R1 ♂ (n = 1155); o— — —o NC ♀ (n = 737); o- - - - -o NC ♂ (n = 723)

## Crosses between R1 and NC

The $F_1$ between NC and R1 possesses red eyes. Since crosses of NC to wild type strain BII show that the red eyed condition is recessive (see below) it must be concluded that the eye color mutation of strain NC involves the *a*-locus. The question arises, then, whether the darker eye color of NC as compared to R1 is due to a darker allele, such as $a^K$ (Piepho 1935), or to modifying genes, like the variations in *aa* eye color

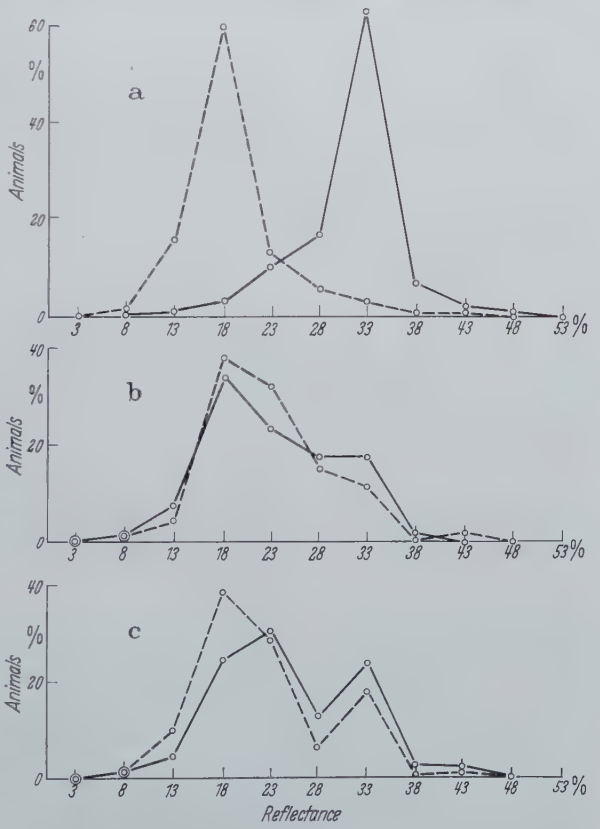



Fig. 5 a—c. Distribution of reflectance values in NC, R1, and reciprocal $F_1$s and $F_2$s. a Pure strains. o———o R1 (n = 2257); o— — —o NC (n = 1460). b $F_1$s. o———o $F_1$ (♀ R1 × ♂ NC) (n = 490); o— — —o $F_1$ (♀ NC × ♂ $F_1$) (n = 694). c $F_2$s. o———o $F_2$ (♀ R1 × ♂ NC) (n = 866); o— — —o $F_2$ (♀ NC × ♂ R1) (n = 608)

shades studied by KÜHN (1948). The crosses described below are intended to answer this question.

The distributions of eye color values for the reciprocal $F_1$ is shown in Fig. 5b. The $F_1$ curves are flatter than those of either one of the two inbred strains, covering almost the entire range of both parental strains. The variabilities of the $F_1$ distributions, as expressed by the standard deviations, are significantly higher than those of the pure strains [S(R1) = 4.23 ± 0.063, S(NC) = 4.13 ± 0.076, S(♀ R1 × ♂ NC) = 6.41 ± 0.289, S(♀NC × ♂ R1) = 5.58 ± 0.212). The distributions of $F_1$ may be called intermediate, or semidominant, since the peaks of both $F_1$ curves coincide with the peak of the NC curve. Slight differences between the reciprocal curves are seen; the differences in the means are not significant [M(♀NC × ♂R1) = 22.726 ± 0.212; M(♀R1 × ♂NC) = 23.435 ± 0,290, t = 1.90, P > 0.05), but those of the standard deviations are significant at the 0.02 level (t = 2.32, P ~ 0.02).

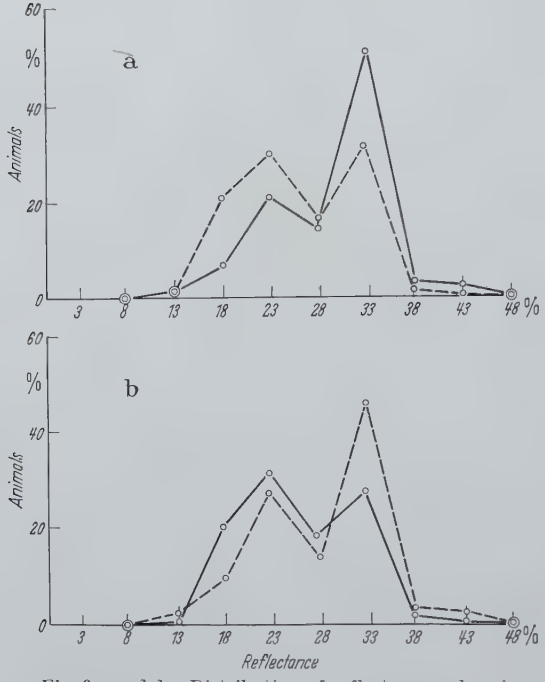



Fig. 6a and b. Distribution of reflectance values in backcrosses of $F_1$ to R1. a ○———○ ♀$F_1$ (♀R1 × ♂NC) × ♂R1 (n = 506); ○——○ ♀R1 × ♂$F_1$ (♀R1 × ♂NC) (n = 562). b ○———○ ♀$F_1$ R (♀NC × ♂R1) × ♂R1 (n = 325); ○——○ ♀R1 × ♂$F_1$ (♀NC × ♂R1) (n = 332)

The backcrosses of $F_1$ to R1 and NC have been carried out in all possible directions. The data are summarized in the curves, Figs. 6 and 7. In all four backcrosses to R1 bimodal curves are obtained (Fig. 6). One mode lies at 33 percent reflectance and corresponds to the value of the mode of pure R1. The darker mode is consistently situated at 23 percent reflectance, lighter than the mode for the $F_1$. The relative numbers of animals at the two modes differ in the different crosses.

The existence of the two modes may be most simply interpreted as due to segregation of one single gene. If this is the case, the mode at 33 percent reflectance would correspond to animals carrying a gene derived from R1 in homozygous condition, while the mode at 23 percent reflectance must correspond to the heterozygotes. The differences in the relative numbers of animals in each peak in different crosses may either be regarded as indicating different survival of the two genotypes, or different phenotypic expression of the heterozygotes which in view of the great variability of the heterozygotes shown in Fig. 5 is not excluded.

If segregation for one major gene is assumed, certain results may be expected for the backcrosses to NC and for $F_2$. The backcrosses to NC should be unimodal,

with a peak at 18 and/or 23 percent reflectance, depending on the phenotype of the heterozygotes. The curves in Fig. 7 show that in all crosses unimodal curves are obtained, and that in three out of the four crosses the curves are very similar to NC. [Means: $M(NC) = 18.692 \pm 0.108$; $M(♀F_1 (♀R1 \times ♂NC) \times ♂NC) = 19.285 \pm 0.209$; $M(♀F_1 (♀NC \times ♂R1) \times ♂NC) = 18.182 \pm 0.137$; $M(♀NC \times ♂F_1 (♀NC \times ♂R1)) = 19.166 \pm 0.243$.] Only in the cross $♀NC \times ♂F_1 (♀R1 \times ♂NC)$ is there a higher proportion of animals in the lighter eye color class 23 percent reflectance, leading to a significantly higher mean ($M = 21.452 \pm 0.245$). The results of the backcrosses to NC are therefore in agreement with the expectation.

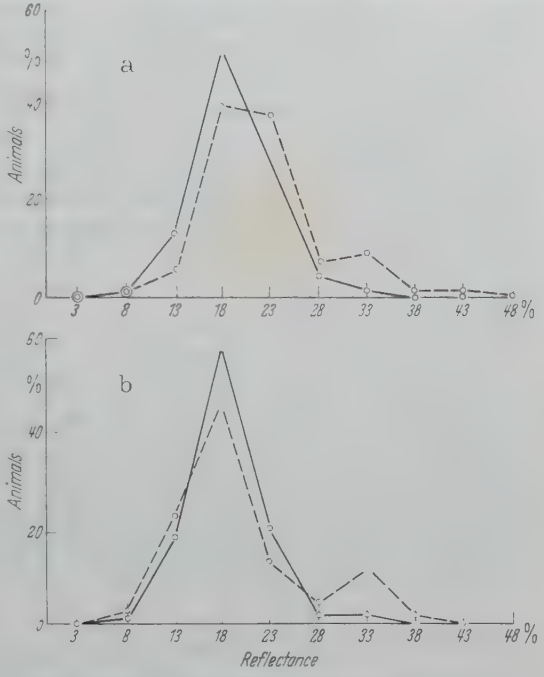



Fig. 7 a and b. Distribution of reflectance values in backcrosses of $F_1$ to NC. a ○——○ $♀F_1 (♀R1 \times ♂NC) \times ♂NC$ (n = 414); ○– – –○ $♀NC \times ♂F_1 (♀R1 \times ♂NC)$ (n = 491). b ○——○ $♀F_1 (♀NC \times ♂R1) \times ♂NC$ (n = 864); ○– – –○ $♀NC \times ♂F_1 (♀NC \times ♂R1)$ (n = 625)

The same is true for the reciprocal $F_2$s. Under the hypothesis of one gene segregation a bimodal curve would be expected, showing one major peak at 18 or 23 percent reflectance, corresponding to the heterozygotes and homozygotes for the gene from NC, and one minor peak at 33 percent reflectance, corresponding to the homozygotes for the gene derived from R1. This is actually obtained as shown in Fig. 5c. In $F_2$, there appears a difference between the reciprocal crosses, which is expressed by a difference in the situation of the darker mode. In the cross $F_2$ ($♀NC \times ♂R1$) the major peak is situated at 18 percent reflectance and the mean for the whole distribution is $M = 21.997 \pm 0.255$. For the reciprocal $F_2$, the mode is situated between 18 and 23 percent reflectance, and the mean is $M = 24.341 \pm 0.216$. The difference in the means of these two reciprocal $F_2$s is highly significant ($t = 7.00$, $P < 0.001$). The major peak would be expected to consist of a mixture of homozygotes and heterozygotes. The difference between the reciprocal $F_2$s may therefore be due to different survival of homozygotes and heterozygotes or to different phenotypic appearance of genotypically identical animals. Because of the great variability of the heterozygotes in $F_1$, the latter hypothesis deserves consideration.

Animals which may be legitimately regarded as heterozygotes are $F_1$ and the darker mode of the backcrosses to R1. $F_1$ is highly variable with a mode at 18 percent reflectance, whereas in backcrosses to R1 the mode for the heterozygotes is consistently located at 23 percent reflectance. This may be interpreted to mean that in R1 modifiers are present which shift the phenotype of

the heterozygotes in the light direction. In the backcrosses to NC and $F_2$, the heterozygotes are included in the same peak with the dark homozygotes. The fact that three of the backcrosses to NC show curves very similar to NC seems to indicate that in these crosses the heterozygotes have a similar phenotype with a peak at 18 percent reflectance. This may be taken as evidence that minor modifiers in strain R1 tend to shift the heterozygotes to lighter values, while minor modifiers present in strain NC tend to make the heterozygotes more similar to homozygous NC animals. It should be added that the alternative possibility of differential survival of homozygotes and heterozygotes is not excluded by these considerations.

Reciprocal differences seem to be indicated in $F_1$ and $F_2$. These are indicated in $F_1$ by an increased proportion of light animals (28—33 percent reflectance) in the cross ♀R1 × ♂NC. In $F_2$, the major mode of cross $F_2$ (♀R1 × ♂NC) is shifted from 18 percent reflectance to 23 percent reflectance, analogous to the location of the darker mode in the outcrosses to R1. Whether these effects are due to the cytoplasm or to the Y-chromosome cannot be decided with certainty, but lack of a difference in the distribution between the two sexes makes the former possibility appear more likely.

The data suggest, then, that the red eye color of strain NC is due to a mutation at the *a*-locus. The difference in eye color between NC and R1 may be ascribed to one major gene whose segregation can be observed in $F_2$ and in the backcrosses to R1. The heterozygote is more variable than either homozygote as indicated by the $F_1$ curves; it tends to be in the darker values, having a mode similar to NC. Further differences in the curves are most easily explained if it is assumed that R1 contains minor modifiers and possibly factors in the cytoplasm or in the Y-chromosome which tend to shift the heterozygotes in a lighter direction.

### Crosses to Wild Type Strain BII

The question remains whether the major gene causing the difference in eye color between NC and R1 is a different allele at the *a*-locus or a modifying gene situated at another locus. This was investigated by crossing NC and R1 to a wild type strain BII and determining the eye color of the red eyed animals segregating in $F_2$. In $F_1$, the eyes were black. As shown in Table 1, the segregations in $F_2$ agree well with the expected 3:1 ratio. There is no evidence for a reduced viability of *aa* animals, as was found by Kühn and Henke (1932).

The distributions of the eye colors of the red eyed animals segregating in $F_2$ are shown in Fig. 8. If the difference between NC and R1 was due to two alleles at the *a*-locus, $a^K$ viz. *a*, unimodal curves with different means should be expected to segregate out in the two crosses. This expectation is contradicted by the results. The segregants from the cross R1 × BII show a bimodal curve with a major peak at 23 percent reflectance and a minor peak at 33 percent reflectance. The curve is very similar to the $F_2$(♀R1 × ♂NC) shown in Fig. 5c. The segregants from $F_2$(NC × BII) show a unimodal curve with a flat peak at 18—23 percent reflectance.

These results seem to indicate that the *a*-allele responsible for red eyes in strain NC is indistinguishable from the original gene *a*. The difference in eye

color between the two strains is due to a major modifier in strain NC which causes *aa* eyes to become dark red. Since the modifier in NC is semi-dominant, it will be designated as *M-a*, its allele in R1 as *m-a*. The outcrosses with BII are interpreted to mean that the wild type strain BII is homozygous for *M-a*. Under this assumption, the $F_2$ from cross R1 × BII should segregate into *M-a/M-a*, *M-a/m-a* and *m-a/m-a*, the latter being lighter. This is indicated by the results. The $F_2$ distribution from the cross BII × NC should be unimodal and identical with that of strain NC. The latter is not the case; the mean for *aa* animals from $F_2$(NC × BII) is M = 20.467 ± 0.510, significantly higher than the value for NC (t = 3.41, P < 0.001). It must therefore be assumed that, besides the minor modifiers which lighten the eye color of *M-a/m-a* heterozygotes whose existence was suggested by the backcrosses to R1, there may occur in BII minor modifying genes which shift *M-a/M-a* homozygotes in a lighter direction.

Table 1. *Segregation of aa animals in $F_2$ from crosses R1 × BII and NC × BII*

| Cross | Black eyes | Red eyes | Total | $\chi^2$ | P (df = 1) |
|---|---|---|---|---|---|
| R1 × BII (expected) | 852 (847.5) | 278 (282.5) | 1130 | 0.096 | > 0.7 |
| NC × BII (expected) | 294 (310.5) | 120 (103.5) | 414 | 3.507 | > 0.05 |
| Pooled (expected) | 1146 (1158) | 398 (386) | 1544 | 0.497 | > 0.5 |

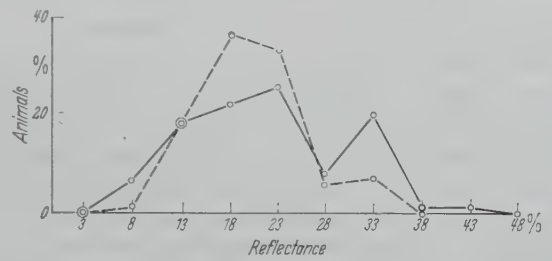



Fig. 8. Distribution of reflectance values in *aa* animals segretating from $F_2$ with a wild type strain. o——o BII × R1 (n = 278); o– – –o BII × NC (n = 120)

### Testis Pigmentation

In earlier observations it was found that at 25° C. R1 has usually unpigmented testes whereas in the $a^K a^K$ strain testes were more frequently pigmented (Caspari 1933). In order to investigate the effect of *M-a* on testis pigmentation, the hatching males were dissected and the presence or absence of testis color recorded. The results for the different crosses are summarized in Table 2.

Table 2. *Frequency of pigmented testes in strains NC, R1 and their crosses*

| Strain | Number of males | Number of pigmented testes | Percent pigmented testes ± SE |
|---|---|---|---|
| NC . . . . . | 723 | 45 | 6.22 ± 0.898 |
| R1 . . . . . | 1155 | 1 | 0.09 ± 0.003 |
| $F_1$ ♀NC × ♂R1 | 341 | 19 | 5.57 ± 1.241 |
| $F_1$ ♀R1 × ♂NC | 260 | 27 | 10.38 ± 1.892 |
| $F_2$ ♀NC × ♂R1 | 300 | 29 | 9.67 ± 1.706 |
| $F_2$ ♀R1 × ♂NC | 477 | 17 | 3.56 ± 0.848 |
| ♀$F_1$ × ♂NC . . | 645 | 114 | 17.67 ± 1.485 |
| ♀NC × ♂$F_1$ . . | 599 | 60 | 10.02 ± 1.227 |
| ♀$F_1$ × ♂R1 . . | 401 | 4 | 1.00 ± 0.496 |
| ♀R1 × ♂$F_1$ . . | 513 | 15 | 2.92 ± 0.744 |
| $F_2$NC × BII . . | 57 | 57 | 100 |
| $F_2$R1 × BII . . | 152 | 152 | 100 |

As expected, the testes of R1 animals were in almost all cases colorless. Is, NC, a certain number of males with pigmented testes was found. In the crossen

the relative number of animals with colored testes correlates roughly with the eye pigmentation represented in Figs. 5—7. A proportion of $F_1$ males comparable to that of NC has colored testes. A difference between reciprocal crosses appears. It is opposite to the direction expected from the eye color, the $F_1$(♀R1 × ♂NC) having a higher percentage of males with pigmented testes than the reciprocal $F_1$. The difference is of doubtful significance ($t = 2.12$, $P > 0.02$, $< 0.05$). The reciprocal $F_2$s, on the other hand, show a highly significant difference in the expected direction, as in the eye pigmentation ($t = 3.20$, $P < 0.01$). The outcrosses to NC and R1 are quite different with respect to testis pigmentation, in accordance with their eye colors. The percentage of colored testes in the outcross to R1 is in the range expected if one half of the animals are heterozygotes. In the backcross to NC, however, significantly more males with pigmented testes were found than in strain NC ($t = 5.83$, $P < 0.001$). In the $F_2$ derived from the crosses to strain BII, all *aa* males had pigmented testes. This may possibly be attributed to a maternal influence of the $a^+a$ mother (Caspari 1936).

## Discussion

The data reported in this paper indicate that the difference in eye pigmentation between strains NC and R1 is due to a pair of alleles different from $a^+$ and $a$ which has been designated as *M-a* and *m-a*. It has been avoided to designate either of the alleles as the wild type allele, even though the evidence seems to indicate that the wild-type strain BII is homozygous for *M-a*. This finding has, however, no bearing on the question concerning the wild-type character of this allele, since the population from which strain NC was derived is probably identical with that from which BII was derived 17 years earlier. It is quite possible that this population was originally homozygous for *M-a* and has remained so.

The heterozygote *M-a*/*m-a* is distinguished by a higher degree of variability than either homozygote as expressed by the great variability of $F_1$ and by the finding that the mode of the heterozygote distribution may be shifted by the action of modifying genes. In a great number of cases, it has been found that in outbreeding species the variability in $F_1$ is reduced as compared to the inbred parental lines (rev. Lerner 1954, Biggers, McLaren and Michie 1958). Lerner (1954), as well as Dobzhansky and Wallace (1953), interpret the lower variability of heterozygotes as an indication of superior developmental homeostasis in the heterozygotes, which in turn is regarded as an indication of the superiority of heterozygotes with regard to adaptive value. It has, however, been pointed out by Thoday (1953) that for certain characters which are involved in active adaptation to the environment, a higher rather than a lower variability may represent the higher adaptive value. For behavioral characters in mammals, a higher variation in $F_1$ as compared with the inbred parental strains has been repeatedly observed and may be interpreted as an indication of superior adaptability (Caspari 1958).

Lewontin (1956) found in certain *Drosophila* crosses that the variation in the number of abdominal bristles was higher in $F_1$ than in parental strains if variation between individuals was considered; if, however, variation between abdominal segments in the same individuals was measured, the heterozygotes were more stable than the homozygotes. He concludes that the relation between

developmental stability, interindividual variation and adaptive value may be more complex than it appears at first sight. Homeostasis, on the genetic as well as on the physiological level consists in keeping certain characters constant, namely those whose constancy is of adaptive significance. The means used in keeping these characters constant consists in increased variability of other physiological characters under changing environmental conditions. In other words, either higher or lower variability may be indicative of superior homeostasis, depending on the character.

For *M-a m-a* heterozygotes it may then be suggested that their increased variability may be of adaptive significance. This possibility cannot be dismissed, since the function of these genes, besides their modifying action on *a*, is unknown.

There remains, however, a second possibility to account for the increased variability of the *M-a m-a* heterozygote. The results of Dobzhansky (1950), Mather (1953) and Thoday (1958) indicate that heterozygote superiority may not necessarily be a consequence of an intrinsic advantage of the heterozygote state, but may itself be the product of selection on outbreeding organisms. This theory involves the creation, by selective forces, of a coadapted gene system which is characterized by superiority of the heterozygotes at a large number of loci. This situation may not be present in cases where the genes in question have not been previously subjected to selection in the same population. This statement probably applies to the alleles *M-a* and *m-a* used in the present investigation, since *M-a* was found in strains of North American origin, while *m-a* was present in a German strain. It should, however, be noted that a similar tendency to increased variability in $F_1$ appears in the curves of Kühn (1948), representing crosses of *aa Ephestia* strains of different shades of eye color. All the strains involved in Kühn's work are of German origin and have been developed by selection from the same original strain. A tendency towards higher variation in $F_1$ may be a general characteristic of modifiers for eye color in *aa* animals.

The absence of inferior viability of *aa* animals in the $F_2$s from the crosses to BII (Table 1) is at variance with the findings of Kühn and Henke (1930, 1932). Since R1 is derived from the same strain with which these authors worked, the difference must be accounted for by differences between the two experiments. It may be assumed that the lower viability of *aa* animals in Kühn and Henke's experiments was due not to the gene *a* but to a closely linked gene. Under this assumption, the gene controlling viability would be assumed to have mutated in the intervening years, and the mutant gene must have replaced the original gene. The finding could, however, also be interpreted by assuming that strain BII contains genes favoring the viability of *aa* animals which were not present in the original wild type strains, or that differences in the conditions of culture, e.g., the food, may account for the different results.

## Summary

1. A red eyed mutation appeared in a wild strain of *Ephestia* which was shown to be located at the *a*-locus. Animals of the new red eyed strain NC have darker eyes than those of the original *aa* strain R1.

2. The $F_1$ between NC and R1 shows higher variability than the parental strains. The mode of its distribution is identical with NC.

3. $F_2$ and the backcrosses $F_1 \times R1$ segregate into two classes, one of which corresponds to R1, the other to $F_1$ and NC. It is concluded that NC and R1 differ in one major pair of alleles determining the brightness of the eye.

4. Outcrosses of NC and R1 to a wild type strain BII indicate that the difference between NC and R1 is not due to different alleles at the *a*-locus, but to a pair of major modifiers, called *M-a* and *m-a*.

5. Minor modifiers in R1 may shift the heterozygotes in the lighter direction. A significant maternal influence was demonstrated in $F_2$; but it is of doubtful significance in $F_1$.

6. R1 and NC differ in the proportion of males having colored testes. The proportion of males with pigmented testes in crosses between NC and R1 corresponds in general to the eye color, except that the backcross $F_1 \times NC$ shows a significantly higher percentage of males with pigmented testes than strain NC.

7. No reduced viability of *aa* animals was indicated in the $F_2$s from the crosses to BII.

## Bibliography

Bigger, J. D., A. McLaren and D. Michie: Variance control in the animal house. Nature (Lond.) **182**, 77—80 (1958). — Caspari, E.: Über die Wirkung eines pleiotropen Gens bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **130**, 353—381 (1933). — Zur Analyse der Matroklinie der Vererbung in der a-Serie der Augenfarben-Mutationen bei der Mehlmotte *Ephestia kühnellia* Z. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **71**, 546—555 (1936). — Genetic basis of behavior. In: Behavior and evolution, edit. by G. G. Simpson and A. Roe, pp. 103—127. New Haven: Yale University Press 1958. — Dobzhansky, Th.: Origin of heterosis through natural selection. Genetics **35**, 288—302 (1950). — Dobzhansky, Th., and B. Wallace: The genetics of homeostasis in *Drosophila*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 162—171 (1953). — Jacobson, E., W. C. Granville and C. E. Foss: Color harmony manual. Explanatory text to 3rd edition. Container Corporation of America 1948. — Kühn, A.: Zur Genetik der helläugigen Mehlmottenstämme. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 136—154 (1948). — Eine neue Mutation in der Ommochrombildungskette bei *Ephestia kühniella* Z. Z. Naturforsch. **12**b, 728—730 (1957). — Kühn, A., and K. Henke: Eine Mutation der Augenfarbe und der Entwicklungsgeschwindigkeit bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **122**, 204—212 (1930). — Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. VIII—XII. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. **15**, 123—219 (1932). — Kühn, A., and V. Schwartz: Über eine weißäugige Mutante (*wa*) von *Ephestia kühniella*. Biol. Zbl. **62**, 226 (1942). — Lerner, I. M.: Genetic homeostasis. New York: John Wiley and Sons 1954. Lewontin, R. C.: Studies on homeostasis and heterozygosity I. Abdominal bristle number in second chromosome homozygotes of *Drosophila melanogaster*. Amer. Naturalist **90**, 237 to 255 (1956). — Mather, K.: Genetical control of stability in development. Heredity **7**, 297—336 (1953). — Piepho, H.: Über die Temperaturmodifikabilität und Genetik zweier rotäugiger Rassen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Zeller. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **133**, 495—517 (1935). — Thoday, J. M.: Components of fitness. Symp. Soc. exp. Biol. **7**, 96—113 (1953). — Homeostasis in a selection experiment. Heredity **12**, 401—415 (1958).

Dr. Ernst Caspari, Department of Biology, Wesleyan University, Middletown, Conn. (USA)

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 273—287 (1959)

Aus dem Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien

# EXPERIMENTELLE BEITRÄGE ZUM PROBLEM DES POSITIVEN HETEROSISEFFEKTES BEI DER STRUKTURPOLYMORPHEN ART *DROSOPHILA SUBOBSCURA*

Von

DIETHER SPERLICH

*(Eingegangen am 23. April 1959)*

Für künstliche Populationen chromosomal polymorpher Arten wurde die selektive Überlegenheit der Strukturheterozygoten gegenüber den strukturell Homozygoten durch Versuche mit Populationskästen bewiesen. Untersuchungen dieser Art wurden mit *Drosophila pseudoobscura* (WRIGHT and DOBZHANSKY 1946; DOBZHANSKY 1947, 1949), *D. persimilis* (SPIESS 1950, 1957), *D. robusta* (LEVITAN 1951) und *D. subobscura* (SPERLICH 1958) durchgeführt. Übereinstimmend ergab sich die Einstellung eines Häufigkeitsgleichgewichts zwischen den Strukturtypen, das von den Selektionswerten der möglichen homo- und heterozygoten Kombinationen der beteiligten Strukturtypen bestimmt wird. Zahlreiche quantitative Untersuchungen über die Strukturtypenhäufigkeit in natürlichen Populationen ergaben, daß auch dort ein Häufigkeitsgleichgewicht vorliegt, jedoch in den meisten Fällen von den wechselnden Umweltsbedingungen ständig verändert wird (s. Zusammenfassung bei MAINX 1956). Für *D. subobscura*, mit der die folgenden Versuche durchgeführt wurden, ergab eine Analyse natürlicher Populationen ein relativ stabiles Heterosisgleichgewicht, die Häufigkeit der einzelnen Strukturtypen scheint trotz der saisonbedingten Umweltsschwankungen ziemlich konstant zu sein (KUNZE-MÜHL, MÜLLER und SPERLICH 1958).

Es ergibt sich nun die Frage nach den Ursachen der positiven Heterosiswirkung. Zur Erklärung können vor allem zwei Hypothesen herangezogen werden. 1. Durch heterozygote Inversionen wird der Austausch praktisch verhindert. Dadurch kann in strukturpolymorphen Arten ein hoch wirksames heterotisches System aufgebaut werden. Die Strukturtypen der einzelnen Chromosomen werden zu Trägern bestimmter Genblöcke, die an die anderen Strukturtypen des homologen Chromosoms so angepaßt sind, daß eine hochgradige, polygene Heterosiswirkung zustande kommt. Es wird innerhalb einer Population ein adaptives System gebildet, das den gegebenen Umweltsbedingungen derselben entspricht (Adaptationshypothese). 2. Die Heterosis kommt durch einen kombinierten Positionseffekt zustande. Die geänderten Lagebeziehungen einzelner Gene modifizieren die Genwirkung, wobei durch die heterozygote Kombination verschiedener Strukturtypen verschiedene Genwirkungen auftreten, die die Vitalität oder Fertilität steigern (Positionseffekthypothese).

Die hier mitgeteilten Untersuchungen sind ein Versuch, Beweise für oder gegen eine der beiden Erklärungshypothesen zu erbringen. Dabei wurden zwei verschiedene Wege eingeschlagen. Einmal wurde versucht, durch Röntgenbestrahlung den Genbesitz eines strukturpolymorphen Stammes von *D. subobscura* mutativ zu ändern, so daß sich Störungen im adaptiven System ergeben,

die sich wieder in einer Verschiebung des Häufigkeitsgleichgewichts der verschiedenen Strukturtypen äußern müßten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein durch Röntgenbestrahlung von *D. subobscura* gewonnener neuer Strukturtyp, der in keiner bis jetzt untersuchten natürlichen Population vorkommt, auf seine Bewährung im Populationskastenexperiment geprüft.

*Störung des adaptiven Systems durch Bestrahlung*

Als Versuchsmaterial diente der Stamm „Lunz-Obersee" (Luob). Dieser Stamm wurde von mehreren Weibchen eines Wildfanges in der Nähe von Lunz (Niederösterreich) abgeleitet. Seit 1950 befindet sich der Stamm Luob als Laboratoriumsstamm in schwacher Inzucht. Für seine Wahl sprach sein hochgradiger Polymorphismus. Er enthielt nach RICHTER und HÜNDLER (1955) in allen Chromosomen außer dem A-Chromosom mehr als einen Strukturtyp. Die Bezeichnung der Strukturtypen erfolgt im weiteren in der von KUNZE-MÜHL und SPERLICH (1955) angegebenen Weise. Eine neuere, genaue Beschreibung der Strukturtypen findet sich bei KUNZE-MÜHL und MÜLLER (1958). Der Stamm Luob enthielt bei der jetzigen Untersuchung folgende Strukturtypen: $A_{St}$; $I_{St}$, $I_1$; $U_{1+2}$, $U_{1+2+6}$; $E_{St}$, $E_8$, $E_{1+2+9}$; $O_{St}$, $O_{3+4+8}$, $O_{3+4+1}$. Gegenüber den Angaben von RICHTER und HÜNDLER (1955) ist in diesem Stamm der Strukturtyp $U_{St}$ nicht vorhanden. $U_{St}$ dürfte durch die lange Laboratoriumshaltung verlorengegangen sein. Da die Analyse der Strukturhomozygoten bei *Drosophila subobscura* in vielen Fällen sehr schwierig ist, wurden immer nur die Frequenzen für die verschiedenen Heterozygoten ermittelt. Tabelle 1 zeigt die Heterozygotenfrequenz im Stamm Luob bei Beginn der Versuche (die Ausdrücke „homo- und heterozygot" sollen im folgenden kurz für „strukturell homo- und heterozygot" verwendet werden).

Tabelle 1. *Heterozygotenfrequenz im Stamm Luob — unbestrahlt*

| Chromosom | *I* | *U* | *E* | | | *O* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Heterozygoter Zustand . . . | $\frac{I_{St}}{I_1}$ | $\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+6}}$ | $\frac{E_{St}}{E_8}$ | $\frac{E_{St}}{E_{1+2+9}}$ | $\frac{E_8}{E_{1+2+9}}$ | $\frac{O_{St}}{O_{3+4+1}}$ | $\frac{O_{St}}{O_{3+4+8}}$ | $\frac{O_{3+4+1}}{O_{3+4+8}}$ |
| Häufigkeit in % | 56,7 | 45,9 | 21,7 | 28,3 | 19,2 | 35,0 | 33,3 | 10,0 |
| $\pm m$ . . . . . | $\pm 4{,}5$ | $\pm 4{,}5$ | $\pm 3{,}8$ | $\pm 4{,}1$ | $\pm 3{,}6$ | $\pm 4{,}4$ | $\pm 4{,}3$ | $\pm 2{,}7$ |

Es kann aus mehreren Gründen angenommen werden, daß die in Tabelle 1 angegebenen Heterozygotenfrequenzen die Gleichgewichtshäufigkeit des Stammes Luob darstellen, die den gegebenen Bedingungen während der Kulturhaltung und auch während des weiteren Versuches entspricht. Um nun das adaptive System der durch die Inversionen vor Austausch geschützten Genblöcke zu stören, wurden während vier Generationen sowohl Weibchen als auch Männchen mit Röntgenstrahlen behandelt. Die Zahl der bestrahlten Fliegen betrug in jeder Generation etwa 400 (200 Weibchen und 200 Männchen). Die Männchen wurden mit einer Gesamtdosis von 4800 r, die Weibchen mit 2400 r bestrahlt. Die in jeder Generation getrennt behandelten virginellen Weibchen und die Männchen wurden nach der Bestrahlung zusammengebracht und auf je 20 Gläser

verteilt. Nach dem Schlüpfen der Nachkommen wurden aus jedem der 20 vorhandenen Gläser je 10 virginelle Weibchen und je 10 Männchen gesammelt, nach Geschlechtern getrennt bestrahlt und dann wieder zufällig auf je 20 Gläser verteilt. Nach dem Durchlaufen von vier aufeinanderfolgenden bestrahlten Generationen ($P$-, $F_1$-, $F_2$- und $F_3$-Generation) wurde noch eine fünfte Generation ($F_4$) herangezogen. Diese Generation wurde nicht mehr bestrahlt. Erst die Larven der $F_5$ dienten der cytologischen Untersuchung. Es wurde somit nach vier bestrahlten eine unbestrahlte Generation eingeschaltet. Dadurch sollten alle durch die Bestrahlung hervorgerufenen Dislokationen, soweit sie keine Aussicht auf längere Erhaltung haben, durch die dazwischenliegende Meiose ausgeschaltet werden. Ferner sollte sich das durch die Stichprobenentnahme eventuell statistisch gestörte Gleichgewicht wieder herstellen. Das Ergebnis der cytologischen Untersuchung der $F_5$ gibt Tabelle 2.

Tabelle 2. *Heterozygotenfrequenz im Stamm Luob — bestrahlt*

| Chromosom | *I* | *U* | *E* | | | *O* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Heterozygoter Zustand . . . | $\frac{I_{St}}{I_1}$ | $\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+6}}$ | $\frac{E_{St}}{E_8}$ | $\frac{E_{St}}{E_{1+2+9}}$ | $\frac{E_8}{E_{1+2+9}}$ | $\frac{O_{St}}{O_{3+4+1}}$ | $\frac{O_{St}}{O_{3+4+8}}$ | $\frac{O_{3+4+1}}{O_{3+4+8}}$ |
| Häufigkeit in % . | 61,6 | 53,3 | 26,7 | 10,8 | 21,7 | 11,7 | 50,0 | 8,3 |
| $\pm m$ . . . . . | $\pm 4{,}4$ | $\pm 4{,}6$ | $\pm 4{,}0$ | $\pm 2{,}8$ | $\pm 3{,}8$ | $\pm 2{,}9$ | $\pm 4{,}6$ | $\pm 2{,}5$ |

Auffällig erscheinen die hohen Heterozygotenfrequenzen für $I_1/I_{St}$ und $O_{St}/O_{3-4-8}$. Für $I_{St}/I_1$ ergibt sich eine Häufigkeit von 61,6%. Die maximale Heterozygotenfrequenz beträgt aber nach der Erwartung nur 50%. Die Abweichung von der erwarteten Maximalhäufigkeit entspricht dem 2,7fachen mittleren Fehler. Ähnlich liegen die Verhältnisse für den Zustand $O_{St}/O_{3+4+8}$, der mit 50% ebenfalls eine unerwartet hohe Heterozygotenfrequenz aufweist. Hier erscheint die Größe 50% deshalb sehr hoch, weil für das $O$-Chromosom drei verschiedene Strukturtypen vorliegen. Der Erwartungswert liegt sicher unter 50%. Da keine Analyse der homozygoten Zustände durchgeführt werden konnte, lassen sich direkte Berechnungen auf Grund der relativen Häufigkeit der Strukturtypen nicht durchführen.

Bevor nun ein Vergleich zwischen der Ausgangs- und der untersuchten $F_5$-Generation durchgeführt werden kann, muß noch auf die neu entstandenen Dislokationen hingewiesen werden. Bei der Untersuchung der $F_5$ traten neben den bereits aus der Ausgangspopulation bekannten heterozygoten Zuständen neue, bisher unbekannte Dislokationen auf. Es muß angenommen werden, daß diese neuen Dislokationen durch die Bestrahlung entstanden und durch eine Meiose erfolgreich hindurchgegangen sind. Es konnten vier verschiedene neue Inversionen und zwei Translokationen festgestellt werden. Das Überwiegen der Inversionen erscheint infolge der zwischen der letzten Bestrahlung und der Untersuchung liegenden Meiose verständlich. Zur Unterscheidung der durch Röntgenstrahlen erzeugten Inversionen von den spontan vorhandenen werden erstere nicht mit einem Ziffern-, sondern mit einem Buchstabenindex bezeichnet. Im $I$-Chromosom konnte in einem Präparat eine kleine, einfache Inversion $I_{(x)}$ gefunden werden. Sie erstreckt sich von 27D bis 29A/29B der Chromosomenkarte

von MAINX, KOSKE und SMITAL (1953) und hat mit schon bekannten, natürlichen Inversionen keine gemeinsame Bruchstelle. Die Untersuchung des Bandscheibenmusters ergab, daß $I_{(x)}$ aus $I_{St}$ entstanden ist, es handelt sich also um einen Strukturtyp $I_x$. Im $U$-Chromosom traten zwei neue Inversionen $U_{(x)}$ und $U_{(y)}$ auf. Die Inversion $U_{(x)}$ hat ihre Bruchstellen bei 42C/42D und 52A mit keiner bekannten natürlichen Inversion gemeinsam. Sie entstand durch Verlagerungen im Strukturtyp $U_{1+2+6}$ und liegt im Präparat als $U_{1+2+6+x}$ vor. Die Inversion $U_{(y)}$, die im weiteren noch genau besprochen werden soll, fand sich als Strukturtyp $U_{1+2+y}$ in zwei Präparaten. Eine genaue Beschreibung dieser Inversion wird später (S. 278) gegeben. Dieser neue Strukturtyp verschwand nicht wie alle anderen strahleninduzierten neuen Strukturtypen nach 1—2 Generationen, sondern konnte weiter erhalten werden. Die Inversion $O_{(x)}$ mit den Bruchstellen bei 86B und 93C trat zusammen mit einer Translokation auf. Sie dürfte zugleich mit dieser entstanden sein, und zwar auf der Grundlage der Standardanordnung. Die Translokation betrifft das $E$- und $O$-Chromosom. An dem gefundenen äußerst komplizierten Inversions-Translokationskomplex waren die Strukturtypen $E_8$, $E_{St}$, $O_{3-4+8}$ und $O_x$ beteiligt. Dieser Komplex läßt sich befriedigend nur unter der Annahme erklären, daß der Stückaustausch zwischen $O_{St}$ und $O_x$ stattgefunden hat. Die Bruchstellen liegen für $O_x$ ungefähr bei 93C und für $E_{St}$ etwa zwischen 64 und 65. Eine zweite Translokation zwischen dem $A$- und $U$-Chromosom konnte nicht vollkommen gedeutet werden. Als sicher kann angenommen werden, daß das $A$-Chromosom im Zustand $A_{St}/A_{St}$ vorliegt, wobei die Translokationsbruchstelle bei 56C/56D liegt. Im $U$-Chromosom dürfte die Kombination $U_{1+2}/U_{1+2+6}$ vorliegen und die Translokationsbruchstelle mit einer Bruchstelle von $U_{(6)}$ identisch sein. Welcher der beiden Strukturtypen von der Translokation betroffen ist, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die neu gefundenen Inversionen und Translokationen wurden in Tabelle 2 folgendermaßen berücksichtigt: Das Präparat mit der Inversion $I_{(x)}$ wurde als im $I$-Chromosom homozygot gewertet, da es als $I_x/I_{St}$ beobachtet wurde. Das Bild $U_{1+2+6+x}/U_{1+2}$ wurde zu $U_{1+2+6}/U_{1+2}$ gezählt, usw.

In Tabelle 3 sind die Heterozygotenfrequenzen des Stammes vor der Bestrahlung und die der $F_5$ nach der Bestrahlung einander gegenübergestellt. Daneben findet sich die Differenz ($D$) zwischen den entsprechenden Frequenzen und deren Streuung $\sigma_D$. Die Größe $t$ wurde aus $t = \frac{D}{\sigma_D}$ gebildet. Die dem gegebenen $t$-Wert entsprechende Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz der Differenz ist unter $p$ in der Tabelle angeführt.

Es zeigt sich in drei Fällen ein signifikanter Unterschied zwischen der Heterozygotenhäufigkeit vor und nach der Bestrahlung. $E_{St}/E_{1+2+9}$ und $O_{St}/O_{3+4-1}$ haben durch die Bestrahlung an Häufigkeit abgenommen, $O_{St}/O_{3+4-8}$ hat hingegen zugenommen. Das bedeutet, daß in zwei von vier Chromosomen Häufigkeitsverschiebungen aufgetreten sind. Berechnet man mit Hilfe der Hardy-Weinberg-Formel die Strukturtypenhäufigkeit für die Chromosomen $O$ und $E$ aus der Heterozygotenfrequenz, so ergibt sich folgendes: Im $O$-Chromosom hat der Strukturtyp $O_{3+4+8}$ an Häufigkeit zugenommen, während $O_{3+4+1}$ und $O_{St}$ weniger häufig geworden sind. Alle Häufigkeitsdifferenzen lassen sich statistisch sichern. Für das $E$-Chromosom ergibt sich ein Häufigkeitsanstieg für $E_8$ und

ein Häufigkeitsabfall für $E_{1-2-9}$ und $E_{St}$. Für $E_8$ ist die Differenz signifikant und für $E_{1+2+9}$ und $E_{St}$ sehr schwach signifikant.

### *Selektionsversuche mit dem durch die Röntgenbestrahlung neu entstandenen Strukturtyp $U_{1+2+y}$*

Wie im vorhergehenden beschrieben wurde, waren im Stamm Luob durch vier Generationen Weibchen und Männchen vor der Kopulation einer starken

Tabelle 3. *Vergleich der Heterozygotenfrequenz in Luob — unbestrahlt und Luob — bestrahlt*

| Heterozygoter Zustand | Frequenz der Heterozygoten | | $D$ | $\sigma_D$ | $t$ | $p$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Luob — unbestrahlt | Luob — bestrahlt | | | | |
| $\frac{I_{St}}{I_1}$ | 0,567 | 0,616 | +0,049 | ±0,064 | 0,77 | 0,50—0,40 |
| $\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+6}}$ | 0,459 | 0,533 | +0,074 | ±0,065 | 1,14 | 0,30—0,20 |
| $\frac{E_{St}}{E_8}$ | 0,217 | 0,267 | +0,050 | ±0,055 | 0,91 | 0,40—0,30 |
| $\frac{E_{St}}{E_{1+2+9}}$ | 0,283 | 0,108 | −0,175 | ±0,051 | 3,43 | <0,001 |
| $\frac{E_8}{E_{1+2+9}}$ | 0,192 | 0,217 | +0,025 | ±0,052 | 0,48 | 0,70—0,60 |
| $\frac{O_{St}}{O_{3+4+1}}$ | 0,350 | 0,117 | −0,233 | ±0,055 | 4,24 | <0,001 |
| $\frac{O_{St}}{O_{3+4+8}}$ | 0,333 | 0,500 | +0,167 | ±0,064 | 2,61 | <0,01 |
| $\frac{O_{3+4+1}}{O_{3+4+8}}$ | 0,100 | 0,083 | −0,017 | ±0,037 | 0,46 | 0,70—0,60 |

Röntgenbestrahlung ausgesetzt worden. Bei einer einige Generationen nach der letzten Bestrahlung durchgeführten Kontrolle des Stammes konnten von den durch die Bestrahlungen entstandenen Dilsokationen nur mehr eine aufgefunden werden. Es handelte sich um die Inversion $U_{(y)}$, die in dem Strukturtyp $U_{1+2}$ entstanden war und als Strukturtyp $U_{1+2+y}$ beobachtet werden konnte. Eine spätere genauere Prüfung des Stammes erfolgte durch Einkreuzung mit dem Standardstamm Küsnacht, der in allen Chromosomen nur die Standardstruktur besitzt. Auffallenderweise war bei dieser Untersuchung die Häufigkeit des Zustandes $U_{St}/U_{1+2-y}$ sehr hoch. Während $U_{St}/U_{1+2}$ und $U_{St}/U_{1+2+6}$ nur eine Häufigkeit von 17,5% bzw. 25,0% aufwiesen, erreichte $U_{St}/U_{1+2+y}$ 57,5%. Es erschien also von Interesse, den Strukturtyp $U_{1+2+y}$ hinsichtlich seiner selektiven Bewährung im Populationskastenversuch zu prüfen. Die Inversion $U_{(y)}$ ist eine kleine, einfache Inversion, die nur etwa zwei Unterabschnitte der Karte umfaßt. Die Lokalisation erfolgte nach der neuen Chromosomenkarte (Kunze-Mühl und Müller 1958). Alle anderen, vorher mitgeteilten röntgeninduzierten Dislokationen waren noch nach der alten Karte (Mainx, Koske und Smital 1953) lokalisiert worden, da zum Zeitpunkt der Untersuchung derselben die neue Karte noch nicht zur Verfügung stand. Der Strukturtyp $U_{1+2+y}$

war der einzige, der beim Erscheinen der neuen Karte noch einer Untersuchung zugänglich war. Die beiden Bruchstellen liegen bei 51C/40A und 41B/41C. Die Bezeichnung erfolgt in der von KUNZE-MÜHL und MÜLLER (1958) angegebenen Weise so, daß die bei Entstehung des Bruches nebeneinanderliegenden Bruchenden angegeben werden. Der eine Bruch (51C/40A) erfolgte an einer Stelle, die auch für die natürlichen Inversionen $U_{(1)}$, $U_{(2)}$, $U_{(7)}$ und $U_{(8)}$ als Bruchstelle angegeben wird (KUNZE-MÜHL und MÜLLER 1958). Es mag hier schon darauf hingewiesen werden, daß eine solche Koinzidenz nicht als rein zufällig angenommen werden kann. Die anderen Bruchenden (41B/41C) fallen mit keinem bisher von natürlichen Dislokationen bekannten Bruchende zusammen.

Zur Durchführung der Versuche mußte ein Stamm gewonnen werden, der für die Strukturanordnung $U_{1+2+y}$ homozygot ist. Durch Geschwisterinzucht während dreier Generationen konnte ein solcher Stamm „Luob 7/11b" abgeleitet werden. Durch Einkreuzung mit dem Standardstamm Küsnacht konnte die strukturelle Zusammensetzung dieses Stammes ermittelt werden. Er enthielt; $A_{St}$; $E_{St}$ und $E_8$; $I_1$; $O_{St}$; $U_{1-2-y}$. Die homozygoten $U_{1+2+y}/U_{1+2+y}$-Tiere erwiesen sich als gut lebensfähig. Zum Vergleich wurden Inzuchtlinien des Stammes Luob herangezogen, also des gleichen Stammes, aus dem nach der Bestrahlung der Stamm „Luob 7/11b" abgeleitet worden war. Die Inzuchtstämme stammen aus Versuchen mit *D. subobscura* von HUBER (1952). Der eine, Luob 7/62153, enthält die Struktur $U_{1+2}$ homozygot, während in Luob 5/33234 das $U$-Chromosom als $U_{1-2}$ und $U_{1+2+6}$ vorliegt. Weiter diente zum Vergleich der Standardstamm Küsnacht (Kü), der in allen Chromosomen die Standardanordnung zeigt. Er wurde seinerzeit von einem Wildfang in Küsnacht in der Schweiz abgeleitet. Es wurden drei Populationskästen angesetzt. An der Methodik wurde gegenüber früheren Untersuchungen an *D. subobscura* (SPERLICH 1958) nichts geändert. Die Anfangsbesetzung der Kästen zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4. *Zusammensetzung der Anfangspopulation. Anteil der verwendeten Stämme in Prozent*

| | | |
|---|---|---|
| Kasten 1 | Luob 7/11b 15% | Luob 7/62153 85% |
| Kasten 2 | Luob 7/11b 15% | Luob 5/33234 85% |
| Kasten 3 | Luob 7/11b 15% | Kü 85% |

Für das $U$-Chromosom war somit in allen Fällen die Struktur $U_{1-2-y}$ mit einer Häufigkeit von 15% eingebracht worden. In Kasten 1 wurde $U_{1-2-y}$ in Konkurrenz mit $U_{1+2}$ gesetzt. Dabei sind $U_{1+2-y}$ und $U_{1+2}$ aus demselben Stamm Luob abgeleitet worden. Es kann angenommen werden, daß die genetischen Unterschiede zwischen $U_{1+2}$ und $U_{1+2+y}$ nicht sehr groß sind, denn $U_{1+2+y}$ leitet sich ja direkt von einem $U_{1+2}$-Chromosom ab. In Kasten 2 waren sowohl $U_{1+2}$ als auch $U_{1+2+y}$ vorhanden. $U_{1+2}$ kann wieder genisch als weitgehend gleich mit $U_{1+2+y}$ gesetzt werden, während $U_{1+2+6}$ schon wegen der Inversion $U_{(6)}$ zumindest für den Bereich dieser Inversion als verschieden von $U_{1+2}$ und $U_{1+2+y}$ betrachtet werden muß. Für den Kasten 3 schließlich wurde ein Strukturtyp $U_{St}$ mit $U_{1-2-y}$ in Konkurrenz gesetzt. $U_{St}$ entstammt einem Stamm, der von einem ganz anderen Standort (Küsnacht, Schweiz) abgeleitet wurde. Es lassen sich der Herkunft nach keine Beziehungen zwischen $U_{St}$ und $U_{1+2+y}$ annehmen.

Für die Auswertung der Kästen wurden jeweils 6 Gläser mit Eiern, die von Fliegen der Populationskästen gelegt worden waren, entnommen und die Speicheldrüsenchromosomen der heranwachsenden Larven untersucht. Es wurde für alle Chromosomen die Häufigkeit der heterozygoten Zustände ermittelt. Nachdem die Ausgangsstämme hinsichtlich ihrer chromosomalen Strukturen qualitativ und quantitativ untersucht waren, konnte für die Ausgangspopulation die erwartete Heterozygotenfrequenz ermittelt werden. Das *A*-Chromosom (= *X*-Chromosom) lag in allen Versuchen als $A_{St}$ vor, heterozygote Zustände traten somit keine auf. Das Ergebnis für die Heterozygotenfrequenzen der Autosomen zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5. *Heterozygotenhäufigkeit in den Populationskästen in Prozent*

Kasten 1

| Ausgangspopulation | $n$ | $\frac{E_{1+2+y}}{E_{St}}$ | $\frac{E_{1+2+y}}{E_s}$ | $\frac{E_s}{E_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+s}}{O_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+1}}{O_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+1}}{O_{3+4+s}}$ | $\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+y}}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 17. 4. | — | 42,5 | 6,4 | 7,5 | 16,2 | 1,8 | 0,2 | 25,5 |
| 8.—10. 6. | 125 | 50,4 | 0,8 | 6,4 | 15,2 | 0,8 | — | 36,0 |
| 20.—22. 8. | 71 | 35,2 | 15,5 | 21,1 | 25,4 | 1,4 | — | 46,5 |
| 10.—16. 1. | 54 | 22,2 | 5,6 | 24,0 | 16,7 | 9,2 | 1,8 | 38,9 |

Kasten 2

| Ausgangspopulation | $n$ | $\frac{E_s}{E_{St}}$ | $\frac{I_1}{I_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+s}}{O_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+1}}{O_{St}}$ | $\frac{O_{3+4+s}}{O_{3+4+1}}$ | $\frac{U_{1+2+y}}{U_{1+2}}$ | $\frac{U_{1+2+y}}{U_{1+2+s}}$ | $\frac{U_{1+2+s}}{U_{1+2}}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 28. 4. | — | 1,4 | 48,9 | 24,6 | 24,6 | 15,7 | 12,8 | 12,8 | 36,1 |
| 13.—16. 6. | 109 | 31,2 | 49,5 | 31,2 | 11,9 | 0,9 | 31,2 | 22,9 | 17,4 |
| 1.—4. 9. | 109 | 39,4 | 52,3 | 23,8 | 24,8 | 4,6 | 32,1 | 11,9 | 28,5 |
| 25.—30. 1. | 121 | 30,6 | 52,1 | 15,7 | 37,2 | 8,3 | 24,0 | 15,7 | 20,6 |

Kasten 3

| Ausgangspopulation | $n$ | $\frac{E_s}{E_{St}}$ | $\frac{I_1}{I_{St}}$ | $\frac{U_{1+2+y}}{U_{St}}$ |
|---|---|---|---|---|
| 2. 5. | — | 13,9 | 25,5 | 25,5 |
| 20.—26. 6. | 130 | 21,5 | 28,5 | 46,1 |
| 21.—25. 3. | 100 | 29,0 | 47,0 | 55,0 |

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, traten neben den heterozygoten Zuständen im *U*-Chromosom solche auch in den anderen Autosomen auf. In den Chromosomen, für die in Tabelle 5 keine Eintragungen durchgeführt sind, waren im Versuch nur homozygote Zustände vertreten. Für Kasten 1 und 2 wurden je drei Stichproben untersucht, für Kasten 3 nur zwei. Es kann angenommen werden, daß zum Zeitpunkt der jeweils letzten Untersuchung in den Kästen annähernd ein Häufigkeitsgleichgewicht eingetreten war. Bevor auf die hier besonders wichtigen Ergebnisse für das *U*-Chromosom eingegangen wird, mögen zuerst die Häufigkeitsverteilungen in den anderen Chromosomen gemeinsam besprochen

werden. Daß es gestattet ist, jedes Chromosom für sich zu betrachten, ergibt sich aus früheren Versuchen, in denen gezeigt werden konnte, daß keine interchromosomalen Wechselwirkungen auftreten (SPERLICH 1958). In allen Fällen traten Häufigkeitsverschiebungen ein, die auf eine Bevorzugung der Heterozygoten schließen lassen. Je nachdem, ob für ein Chromosom zwei oder drei verschiedene Strukturtypen vorlagen, stellte sich die Heterozygotenhäufigkeit ein. Für die Fälle, wo nur zwei Strukturtypen je Chromosom vorlagen, wurde die maximale Heterozygotenhäufigkeit von 50% von $I_1/I_{St}$ in Kasten 2 und 3 erreicht. Auch $U_{1+2+y}/U_{St}$ in Kasten 3 zeigt dieselbe Häufigkeit. $E_8/E_{St}$ erreicht in Kasten 2 und 3 ungefähr 30%. Kein heterozygoter Zustand ist gesichert häufiger als 50%. Für drei Strukturtypen je Chromosom liegen die Verhältnisse anders. Hier kann die maximale Heterozygotenfrequenz folgendermaßen berechnet werden: Die Heterozygotenhäufigkeit $H$ ist eine Funktion der Häufigkeit der beteiligten Strukturtypen ($_{q1}$, $_{q2}$...). Für drei Strukturtypen gilt:

$$H = 2q_1 q_2 + 2q_2 q_3 + 2q_1 q_3 \tag{1}$$

und

$$q_1 + q_2 + q_3 = 1 \tag{2}$$

Durch Einsetzen von (2) in (1) erhält man durch Differenzierung von (1) die Häufigkeit der Strukturtypen bei maximaler Heterozygotenfrequenz. Es zeigt sich, daß dann

$$q_1 = q_2 = q_3 = {}^1/_3 \tag{3}$$

sein muß. Eingesetzt in (1) erhält man:

$$H = {}^2/_9 + {}^2/_9 + {}^2/_9 = {}^2/_3 \tag{4}$$

Die maximale Häufigkeit für alle heterozygoten Zustände zusammen ist also 66,6%. Dieser Wert wird in allen Stichproben für das $U$-Chromosom in Kasten 2 erreicht. Die Werte sind 71,5%, 72,5% und 60,3%. Auch für das $E$-Chromosom in Kasten 1 wird bei der Präparation am 20.—22. 8. eine Gesamtheterozygotenhäufigkeit von 71,8% erreicht. Für die beiden anderen Stichproben von Kasten 1 ergeben sich 57,6% bzw. 51,8% Heterozygote für das $E$-Chromosom. Indessen läßt sich für keinen Fall eine gesichert höhere Heterozygotenfrequenz als 66,6% nachweisen. Immerhin scheint es interessant, daß die maximale Heterozygotenfrequenz mehrmals erreicht wird. Dies weist zumindest für das $U$-Chromosom in Kasten 2 darauf hin, daß alle Strukturtypen im heterozygoten Zustand ungefähr gleiche Selektionswerte aufweisen und auch die drei möglichen heterozygoten Zustände ungefähr gleichwertig sind. Für das $O$-Chromosom liegen die Gesamtwerte der Heterozygotenhäufigkeit teilweise etwas niedriger, und zwar für Kasten 2 ungefähr um 60% und für Kasten 1 bei 27%. In beiden Kästen waren die gleichen Strukturtypen des $O$-Chromosoms eingebracht worden. Dieser Unterschied zwischen Kasten 1 und 2 für die Verhältnisse im $O$-Chromosom läßt sich so deuten, daß in Kasten 1 infolge der niedrigen Anfangshäufigkeit von $O_{3+4+1}$ das Gleichgewicht noch nicht erreicht war.

An dieser Stelle mag auch noch auf eine interessante Tatsache hingewiesen werden, die auch bei diesen Versuchen für das $O$-Chromosom festgestellt werden konnte. In keinem der Populationskästen, in denen die heterozygoten Zustände $O_{3+4+1}/O_{St}$ bzw. $O_{3+4+8}/O_{3+4+1}$ auftraten, konnte jemals ein Austausch zwischen $O_{(1)}$ und den Komplexen $O_{(3+4)}$ bzw. $O_{(3+4+8)}$ beobachtet werden. Ein solcher

hätte zu den Strukturtypen $O_{3+4\cdot 8\cdot 1}$ bzw. $O_1$ führen müssen, die jedoch niemals auftraten. Sowohl in Kasten 1, besonders aber in Kasten 2, in denen die Kombinationen $O_{3-4\cdot 8}/O_{3+4+1}$ und $O_{St}/O_{3\cdot 4\cdot 1}$ teilweise häufig auftraten, konnte keine Trennung beobachtet werden. Die Inversionen $O_{(3)}$, $O_{(4)}$ und $O_{(8)}$ liegen alle im distalen Chromosomenabschnitt, einander teilweise übergreifend. $O_{(3)}$ und $O_{(4)}$ treten immer miteinander als Komplex $O_{(3+4)}$ auf. Der Strukturtyp $O_{(3+4)}$ ist einer der häufigsten in natürlichen Populationen (Richter und Hündler 1955, Kunze-Mühl, Müller und Sperlich 1958). $O_{(8)}$ tritt niemals allein auf, sondern immer zusammen mit $O_{(3\cdot 4)}$ als Strukturtyp $O_{3+4\cdot 8}$. Eine Trennung oder Neukombination dieser Inversionen ist nicht zu erwarten, da sie einander übergreifen und im heterozygoten Zustand komplexe Inversionsschlingen ergeben. Cross-over-Vorgänge in den Schlingen würden zu azentrischen und dizentrischen Chromatiden führen. Anders liegt der Fall für $O_{(1)}$. Diese einfache Inversion liegt ungefähr in der Mitte des Chromosoms. Sie umfaßt beiläufig den Bereich 82—86 der Chromosomenkarte. Die Komplexe $O_{(3+4)}$ bzw. $O_{(3+4\cdot 8)}$ erstrecken sich ungefähr von 91 bis 98. [Die Angaben über die Inversionsbereiche beziehen sich auf die Chromosomenkarte von Kunze-Mühl und Müller (1958), deren Arbeit auch die vorhergehenden und die folgenden Lokalisationsangaben entnommen sind.] Zwischen $O_{(1)}$ und $O_{(3\cdot 4)}$ bzw. $O_{(3+4-8)}$ liegen die Abschnitte 87—90, die sich auch in den Heterozygoten in der normalen Sequenz paaren. Ein Cross-over in diesem Bereich führt zu ganz normalen Chromatiden. Es würden lediglich aus den Strukturheterozygoten $O_{3-4+1}/O_{St}$ und $O_{3-4+1}/O_{3+4+8}$ die neuen Strukturkombinationen $O_1$ und $O_{3\cdot 4\cdot 8\cdot 1}$ entstehen. Da diese Strukturtypen niemals auftreten, könnte also angenommen werden, daß der Bereich 87—90 zwischen den Inversionsschlingen ebenfalls blockiert ist. Die Inversionsschlingen könnten über ihren Bereich hinaus als Cross-over-Verhinderer wirksam sein. Dieser Annahme widersprechen aber Austauschversuche mit markierten *O*-Chromosomen unter Verwendung verschiedener Strukturtypen (Koske und Maynard Smith 1954). Der heterozygote Zustand $O_{3\cdot 4}/O_{3+4+12+13}$ zeigt die zwei Inversionsschlingen $O_{(12)}$ und $O_{(13)}$, während $O_{(3-4)}$ im homozygoten Zustand vorliegt. Die beiden Inversionsschlingen umfassen ungefähr folgende Bereiche: $O_{(13)}$: 93, 94 und 99; $O_{(12)}$: 88, 89 und 90. In $O_{3\cdot 4}/O_{3+4+12\cdot 13}$ liegen zwischen den Inversionsschlingen $O_{(12)}$ und $O_{(13)}$, homozygot gepaart, die sechs Abschnitte 91, 92 und 95 bis 98. Das Stück zwischen den Inversionsschlingen ist also bei $O_{3+4+1}/O_{3+4}$ bzw. $O_{3+4+1}/O_{3-4+8}$ annähernd gleich groß wie bei $O_{3+4}/O_{3+4+12+13}$. Für $O_{3\cdot 4}/O_{3+4\cdot 12\cdot 13}$ konnte jedoch mit Hilfe der Markierungsgene *ch (cherry)* und *kk (kinky)* nachgewiesen werden, daß zwischen $O_{(12)}$ und $O_{(13)}$ ein Austausch von 1,2% erfolgt. Somit kann auch zwischen $O_{(3+4)}$ und $O_{(1)}$ ein Cross-over erwartet werden. Es kann angenommen werden, daß ein Austausch auch tatsächlich erfolgt, die neuen Strukturtypen $O_1$ bzw. $O_{3+4\cdot 8+1}$ jedoch selektiv ausgemerzt werden und somit im Konkurrenzversuch nicht zur Beobachtung gelangen. Das gleiche dürfte auch in der Natur der Fall sein, wo die durch Austausch zu erwartenden Strukturtypen noch nie gefunden werden konnten.

Das weitaus größte Interesse beanspruchen indessen die Verhältnisse im *U*-Chromosom. Wie Tabelle 5 zeigt, konnte in allen drei Kästen ein Gleichgewichtszustand erreicht werden, bei dem die verschiedenen heterozygoten Zustände mit $U_{1+2+y}$ relativ häufig aufscheinen. Im Kasten 1 war $U_{1+2+y}$ aus

dem bestrahlten Stamm Luob 7/11b mit $U_{1+2}$ in Konkurrenz gesetzt worden, das ebenfalls aus Luob stammt. Das Ergebnis zeigt eine durchschnittliche Heterozygotenhäufigkeit von etwa 40%. Die Anfangshäufigkeit von $U_{1+2+y}$ war 15%, der heterozygote Zustand $U_{1+2+y}/U_{1+2}$ somit nur mit 25,5% zu erwarten. Eine Häufigkeitszunahme der Heterozygoten auf 40% läßt auf eine Heterosiswirkung schließen. Es muß also angenommen werden, daß $U_{1+2+y}$ und $U_{1+2}$ instande sind, miteinander heterozygote Zustände zu bilden, die selektiv stark begünstigt sind. In Kasten 2 zeigt sich, daß $U_{1+2+y}$ auch in Konkurrenz mit $U_{1+2+6}$ und $U_{1+2}$ (beide aus Luob) nicht an Häufigkeit abnimmt und mit beiden Strukturtypen selektiv bevorzugte, heterozygote Zustände bildet. In Kasten 3 wurde der aus Küsnacht (Schweiz) stammende Strukturtyp $U_{St}$ mit dem neuen Strukturtyp $U_{1+2+y}$ in Konkurrenz gesetzt. Der heterozygote Zustand $U_{St}/U_{1+2+y}$ erreicht bei der letzten Untersuchung eine Häufigkeit von 55%. Dieses hohe Häufigkeitsgleichgewicht war zu erwarten. Es entpricht dem in früheren Versuchen mehrfach geprüften Häufigkeitsgleichgewicht des heterozygoten Zustandes $U_{1+2}/U_{St}$. $U_{St}$ war auch dort immer aus dem Stamm Küsnacht, $U_{1+2}$ teilweise aus dem Stamm Biganzolo (Oberitalien), teilweise aus dem Stamm Luob abgeleitet worden (SPERLICH 1958). Da $U_{1+2+y}$ aus $U_{1+2}$ entstanden war, konnte für den Selektionsversuch angenommen werden, daß sich $U_{1+2+y}$ gegenüber anderen Strukturtypen wie $U_{1+2}$ verhält.

Tabelle 6. *Strukturtypenhäufigkeit im U-Chromosom. (Kasten 3, 21.—25. 3.)*

| | $\frac{U_{1+2+y}}{U_{St}}$ | $\frac{U_{St}}{U_{St}}$ | $\frac{U_{1+2+y}}{U_{1+2+y}}$ | $U_{1+2+y}$ | $U_{St}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Häufigkeit in % | 55,0 | 29,0 | 16,0 | 43,5 | 56,5 |

Bei der letzten Untersuchung in Kasten 3 wurden für das $U$-Chromosom nicht nur die Heterozygoten gezählt, sondern auch die homozygoten Zustände nach der Bandscheibenfolge analysiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 6.

Es zeigt sich, daß $U_{St}$ häufiger ist als $U_{1+2+y}$. Das würde bedeuten, daß der Zustand $U_{1+2+y}/U_{1+2+y}$ weniger vital ist als $U_{St}/U_{St}$, vorausgesetzt, daß die Population bereits ihr Gleichgewicht erreicht hat. Die Heterozygotenhäufigkeit beträgt aber über 50%. Das müßte wieder mit einer hohen Vitalität der Heterozygoten erklärt werden. Allerdings ist die Aussage, daß $U_{1+2+y}$ weniger häufig ist als $U_{St}$, nur sehr schwach gesichert ($x^2 = 3{,}38$, $p = 0{,}05$).

## Diskussion der Ergebnisse

Ein Ziel dieser Untersuchungen war die Prüfung der Hypothesen, die bisher zur Deutung der strukturellen Heterosiswirkung aufgestellt worden sind. Für die Adaptationshypothese sprechen folgende Tatsachen: Die Heterosiswirkung in Strukturheterozygoten läßt sich leicht mit der allgemeinen Hypothese über Heterosiswirkungen, wie sie aus der Tier- und Pflanzenzüchtung bekannt ist, in Einklang bringen. Zahlreiche Versuche mit verschiedenen strukturpolymorphen Drosophilaarten deuten auf den tatsächlichen Bestand eines adaptiven Heterosisgleichgewichtes in natürlichen Populationen hin. Als besonders beweisend erscheinen die Ergebnisse, die durch Konkurrenzversuche mit

*Drosophila pseudoobscura* gewonnen wurden. Dabei zeigte es sich, daß zwischen Strukturtypen, die vom gleichen Standort abgeleitet worden waren, immer ein Heterosisgleichgewicht erreicht wird. Bei Konkurrenzversuchen, in denen Strukturtypen geographisch verschiedener Herkunft verwendet wurden, ergab sich meist kein Heterosisgleichgewicht, sondern einer der Strukturtypen wurde aus der Population verdrängt. Dies würde bedeuten, daß Strukturtypen verschiedener geographischer Herkunft nicht aneinander adaptiert sind und somit oft im heterozygoten Zustand keinen positiven Heterosiseffekt ergeben (Dobzhansky 1948, 1950). Ähnlich lassen sich die Ergebnisse einer Arbeit mit *D. willistoni* deuten. Auch hier zeigt sich ein Zusammenbruch des adaptiven Systems bei Mischung von Strukturtypen verschiedener geographischer Standorte. Der fehlende positive Heterosiseffekt ließ sich hier durch eine fehlende Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung beweisen (Dobzhansky und Pavlovsky 1957). Bei *Drosophila subobscura* konnte bisher in Populationskastenversuchen stets die Einstellung eines Heterosisgleichgewichtes beobachtet werden, auch dann, wenn die verwendeten Strukturtypen sehr verschiedener geographischer Herkunft waren (Sperlich 1958, Ruderer 1959). Die Art der Anstellung dieser Versuche weicht allerdings von den oben zitierten Arbeiten so weit ab, daß sie kein strenger Beweis gegen die Annahme sind, daß es auch bei dieser Art standortsmäßig verschiedene, adaptive genische Besonderheiten der Strukturtypen geben könnte. Die vorliegenden Ergebnisse mit Röntgenbestrahlung lassen sich auch im Sinne einer genischen Adaptation der Strukturtypen deuten. Wie Tabelle 3 zeigt, waren für zwei Chromosomen Häufigkeitsverschiebungen unter den Strukturtypen feststellbar, die sich an der geänderten Heterozygotenfrequenz zeigen. Es kann angenommen werden, daß durch die Erhöhung der Mutationsrate im Verlaufe der durch mehrere Generationen durchgeführten Bestrahlung eine teilweise Störung im adaptiven System aufgetreten ist. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß vieles für das Bestehen eines adaptiven Systems auf genischer Grundlage spricht. Inwieweit indessen diese Annahme für alle chromosomal polymorphen Arten gilt und inwieweit alle Phänomene der Strukturheterozygotie damit erklärbar sind, wäre noch zu untersuchen.

Mainx (1955, p. 446) wies bereits darauf hin, daß für den primären Einbau eines neuen Strukturtyps in eine Population die Adaptationshypothese keine befriedigende Erklärung gibt. Für diese Hypothese müßte angenommen werden, daß der einmal neu entstandene Strukturtyp nur dann erhalten bleibt, wenn der durch die Inversion eingeschlossene Genblock zufällig an einen anderen, schon bestehenden Strukturtyp bereits im Sinne der Heterosiswirkung mehrerer Gene adaptiert wäre. Abgesehen davon, daß eine solche „Präadaptation" sehr unwahrscheinlich ist, versagt obige Annahme auch, wenn man von einer strukturell monomorphen Population ausgeht. Für einen ständigen Heterosiseffekt wäre eine hochgradige Homogenität der Population im Genbesitz Voraussetzung. Der neu entstandene, spontan adaptierte Strukturtyp müßte immer wieder im heterozygoten Zustand im Hinblick auf den Gengehalt denselben Partner finden, um sich selektiv genügend zu vermehren. Für die ursprüngliche Struktur, aus der der neue Strukturtyp entstanden ist, kann diese weitgehende Homogenität jedoch nicht angenommen werden. Für die Frage des primären Einbaues eines neuen Strukturtyps in die Population erscheint die Adaptationshypothese also

als nicht befriedigend. Wenn ein neuer Strukturtyp in einer Population schon stark verbreitet ist, wäre allerdings seine sukzessive Adaptation im Gengehalt an die schon bestehenden Strukturtypen und umgekehrt im Sinne einer Steigerung der Heterosiswirkung vorstellbar. Diese Annahme erklärt auch viel besser die obengenannten Ergebnisse populationsgenetischer Untersuchungen. Es muß für die gleichen Strukturtypen, die in weiten Arealen mit verschiedenen ökologischen Bereichen vorkommen, angenommen werden, daß sie in verschiedener Weise adaptiert sind, und das wäre nur durch eine sukzessive Adaptation der bereits weitverbreiteten Strukturtypen erklärbar.

Bevor auf die Folgerungen, die sich aus der Positionseffekthypothese ergeben, eingegangen wird, mögen zuerst die Beobachtungen besprochen werden, die für und wider diese sprechen. Gegen die Positionseffekthypothese spricht vor allem, daß sich aus rein genetischen Versuchen kein Anhaltspunkt dafür ableiten läßt, daß kombinierte Positionseffekte im heterozygoten Zustand Wirkungen im Sinne einer besseren Vitalität oder Fruchtbarkeit entfalten, während Heterosiserscheinungen in der Züchtung meistens auf der Basis von Genwirkungen erklärt werden. Wohl gibt es zahlreiche Beweise dafür, daß Lagebeziehungen der Gene für ihre Wirkung eine wichtige Rolle spielen, doch fehlen, soweit dem Verf. bekannt, Untersuchungen über die Wirkung im heterozygoten Zustand in bezug auf Vitalität und Fertilität, wenn nicht der zweite Teil dieser Arbeit als eine solche Untersuchung gewertet werden soll. Für die Positionseffekthypothese spricht, daß bei *D. subobscura* die Bruchenden der verschiedenen natürlichen Inversionen auffallend häufig zusammenfallen. Neuerdings wurde von ROTHFELS und FAIRLIE (1957) ein weiterer sehr eindrucksvoller Fall mitgeteilt. Bei dem hochpolymorphen *Tendipes decorus* ist die Häufung gleicher oder annähernd gleicher Bruchstellen bei den natürlichen Inversionen besonders hoch. Eine solche mehrfache Bruchkoinzidenz kann nicht als zufällig angesehen werden (KUNZE-MÜHL und SPERLICH 1955). Zur Deutung dieses Phänomens wurden mehrere Hypothesen entwickelt. Eine davon, nämlich die Hypothese, daß im Chromosom Prädilektionsstellen für einen Bruch vorliegen, wurde näher untersucht (KUNZE-MÜHL und MÜLLER 1959). Es zeigte sich bei der Analyse strahleninduzierter Dislokationen, daß die Bruchstellen nicht zufällig verteilt sind; eine Erklärung für die mehrfache Koinzidenz bei natürlichen Inversionen ließ sich daraus aber nicht gewinnen. Zwanglos erklärt sich diese unwahrscheinliche Bruchverteilung mit der Positionseffekthypothese. Günstige Positionseffekte gehen eben nur von bestimmten Stellen aus. Nur wenn Bruchereignisse und Verlagerungen an bestimmten Stellen stattfinden, kann eine Inversion entstehen, die Aussicht auf Erhaltung hat. Von besonderem Interesse erscheint im Hinblick darauf die in dieser Arbeit besprochene strahleninduzierte Inversion $U_{(y)}$. Der eine der Brüche, der für die Inversion $U_{(y)}$ angenommen werden muß, erfolgte an einer Stelle, die auch für andere natürliche Inversionen als Bruchstelle auftritt. Sowohl $U_{(1)}$, $U_{(2)}$ als auch $U_{(7)}$ und $U_{(8)}$ haben zumindest ein Bruchende mit $U_{(y)}$ gemeinsam. Gerade für diese Inversion in Form des Strukturtypes $U_{1+2+y}$ zeigt sich eine selektive Bewährung im Konkurrenzversuch. Wie gezeigt werden konnte (Tabelle 5), bildet $U_{1+2+y}$ sowohl mit $U_{1+2}$ als auch mit $U_{1+2+6}$ und $U_{St}$ heterozygote Zustände, durch deren Bevorzugung es zur Ausbildung eines Heterosisgleichgewichtes kommt. Besonders wichtig erscheint der Versuch mit Kasten 1.

Hier sind es die Strukturtypen $U_{1+2}$ und $U_{1+2+y}$, die konkurrieren. Durch Bestrahlung war aus $U_{1+2}$ desselben Stammes $U_{1+2-y}$ entstanden. Die positive Heterosiswirkung muß für diesen Fall auf einen Positionseffekt zurückgeführt werden, wenn man nicht annehmen will, daß $U_{(y)}$ durch die Bestrahlung zufällig an $U_{1+2}$ genisch adaptiert wurde. In Kasten 2 zeigt es sich, daß die heterozygoten Zustände $U_{1+2}/U_{1-2+6}$, $U_{1+2}/U_{1-2+y}$ und $U_{1+2+6}/U_{1+2+y}$ ungefähr gleiche Gleichgewichtshäufigkeit erreichen. Das bedeutet, daß die Strukturtypen $U_{1+2}$, $U_{1-2+6}$ und $U_{1+2+y}$ im homozygoten Zustand ungefähr gleichwertig sind und daß $U_{1-2-y}$ ebenso gut an $U_{1+2}$ adaptiert ist wie $U_{1+2+6}$. In Kasten 3 erreicht der heterozygote Zustand $U_{1-2+y}/U_{St}$ eine Häufigkeit von über 50%. Bei der Analyse der homozygoten Zustände zeigt es sich, daß $U_{St}$ etwas häufiger ist als $U_{1+2-y}$ (Tabelle 6). Das bedeutet, daß $U_{St}/U_{St}$-Tiere etwas vitaler als $U_{1-2-y}/U_{1+2+y}$-Tiere sind. Daß sich trotzdem ein Häufigkeitsgleichgewicht einstellt, bei dem die Heterozygoten eine Frequenz von 50% erreichen, ist auf den hohen selektiven Vorteil der Heterozygoten zurückzuführen. Wenn ein Vergleich zwischen Kasten 1 und Kasten 2 erlaubt ist, so läßt sich sagen, daß $U_{1+2-y}$ mit $U_{St}$ wirksamere heterozygote Zustände bildet als mit $U_{1+2}$. Das könnte mit der Annahme erklärt werden, daß der Strukturtyp $U_{1+2}$ an $U_{St}$ in der Natur bereits sukzessiv adaptiert wurde. $U_{1+2-y}$ weist dieselbe Adaptation an $U_{St}$ auf wie $U_{1-2}$, da ja $U_{1-2-y}$ aus $U_{1+2}$ entstanden ist. Dazu kommt noch der Positionseffekt von $U_{(y)}$. $U_{St}$ und $U_{1-2}$ entstammen verschiedenen geographischen Gebieten, doch sind die beiden Ursprungsgebiete annähernd ökologisch gleichwertige Gebiete des Alpenmassivs. Eine kontinuierliche Verbindung zwischen den Ausgangspopulationen und somit die Möglichkeit einer sukzessiven Adaptation sind nicht ausgeschlossen. Auch die obenerwähnte Tatsache, daß zwischen gewissen Strukturtypen des *O*-Chromosoms niemals Austauschvorgänge beobachtet wurden, die zu einer Neukombination verschiedener Inversionen führen, läßt sich mit der Positionseffekthypothese besser erklären. Eine Umkombination der Inversionen führt zu neuen Kombinationen von Positionseffekten, die zu einem Zusammenbruch der Heterosiswirkung führen könnten.

Aus allem vorher Gesagten ließe sich nun das folgende Bild gewinnen: Die verschiedenen natürlichen Strukturtypen sind aneinander genisch adaptiert im Sinne einer Leistungssteigerung im heterozygoten Zustand. Ebenso gehen aber auch von den verschiedenen Strukturtypen Positionseffekte aus, die in den Strukturheterozygoten erhöhte Vitalität oder Fertilität bedingen. Der Einbau neu entstandener Inversionen in die Population hängt vom Positionseffekt der verlagerten Chromosomenstruktur ab. Nur solche Dislokationen werden zum ständigen Besitz einer Art, von denen ein positiver Positionseffekt im heterozygoten Zustand ausgeht. Die Austauschblockade durch die Inversionen führt dann zur sukzessiven, genischen Adaptation zwischen zwei oder mehreren Strukturtypen, die bei verschiedenen Arten zu verschieden hoher Spezialisierung gediehen ist. Die Strukturheterozygoten einer lokalen Population sind in dieser Beziehung mehr oder weniger streng den ökologischen Bedingungen des Standortes angepaßt. Dabei kann die sekundäre Adaptation den Positionseffekt weitgehend überdecken, so daß bei der Untersuchung natürlicher Populationen nur mehr das genisch-adaptive System in seiner Wirkung hervortritt. So erklären sich auch die Ergebnisse, daß Strukturtypen verschiedener geographischer und

ökologischer Gebiete keinen positiven Heterosiseffekt miteinander ergeben können. Der hochspezialisierte Genbestand in den Strukturtypen führt dann zum Zusammenbruch des adaptiven Systems, so daß sogar ein negativer Heterosiseffekt entstehen kann, der den Positionseffekt überdeckt.

Wird der strukturelle Polymorphismus im Sinne der Goldschmidtschen Strukturmustervorstellung betrachtet, so ließen sich Positionseffekt und sukzessive, genische Adaptation auf einen gemeinsamen Nenner bringen. Die sichtbare Makro-Inversion wäre dann der erste Mutationsschritt, dem zahlreiche andere gleichartige subvisible Strukturverlagerungen folgen. Für evolutionistische Betrachtungen erscheint eine solche Annahme fruchtbar, doch müßten für sie erst genügend experimentelle Beweise erbracht werden.

Herrn Prof. F. MAINX danke ich für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise, Frl. G. SKROB für die Überlassung von Versuchsstämmen und von Zahlenmaterial.

## Zusammenfassung

1. Ein chromosomal hochpolymorpher Stamm von *Drosophila subobscura* wurde in vier aufeinanderfolgenden Generationen je einer einmaligen Röntgenbestrahlung ausgesetzt. Eine dadurch bewirkte Verschiebung der Gleichgewichtshäufigkeit der Strukturheterozygoten wird als Störung im genisch adaptiven System der Strukturtypen gedeutet.

2. Eine durch Bestrahlung neu entstandene Inversion wurde im Konkurrenzversuch geprüft. Neben einem neuen Strukturtyp ($U_{1+2+y}$) wurden in drei verschiedenen Versuchen der Strukturtyp, aus dem der neue entstanden war ($U_{1+2}$), ein anderer Strukturtyp desselben Stammes ($U_{1+2+6}$) und ein anderer eines fremden Stammes ($U_{St}$) verwendet. Der neue Strukturtyp bildete mit allen anderen Strukturtypen selektiv bevorzugte heterozygote Zustände, was durch das Erreichen eines Heterosisgleichgewichtes zum Ausdruck kam. Der positive Heterosiseffekt muß zumindest für diesen Fall als Positionseffekt gedeutet werden.

3. Während die vor allem von TH. DOBZHANSKY vertretene Adaptationshypothese allein keine vollständige Erklärung für alle Phänomene des Strukturpolymorphismus gibt, besitzt ihre Synthese mit der Positionseffekthypothese großen Erklärungswert. Es wird angenommen, daß die primäre Ausbreitung einer neuen Dislokation vom Positionseffekt abhängt. Durch die Austauschblockade kommt es dann sekundär zu einer sukzessiven, genischen Adaptation der verschiedenen Strukturtypen. Diese Adaptation kann dann später den Positionseffekt so überdecken, daß dieser nicht mehr direkt zur Beobachtung kommen kann.

## Literatur

DOBZHANSKY, TH.: Genetics of natural populations. XIV. A response of certain gene arrangements in the third chromosome of *Drosophila pseudoobscura* to natural selection. Genetics **22**, 142—160 (1947). — Genetics of natural populations. XVIII. Experiments on chromosomes of *Drosophila pseudoobscura* from different geographic regions. Genetics **33**, 588—602 (1948). — Observations and experiments on natural selection in *Drosophila*. Proc. VIII. Int. Congr. Genetics 1949. Hereditas (Lund) Suppl. 210—224 (1949). — Genetics of natural populations. XIX. Origin of heterosis through natural selection in populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics **35**, 288—302 (1950). — DOBZHANSKY, TH., and O. PAVLOVSKY: Interracial hybridization and breakdown

of coadapted complexes in *Drosophila paulistorum* and *Drosophila willistoni*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 622—629 (1959). — Huber, Ch.: Die Mannigfaltigkeit der chromosomalen Struktur von *Drosophila subobscura* unter den Bedingungen der Inzucht. Diss. Universität Wien 1952. — Koske, Th., and Maynard Smith: Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. X. The fifth linkage group. J. Genet. **52**, 536—541 (1954). — Kunze-Mühl, E., u. E. Müller: Weitere Untersuchungen über die chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. Chromosoma (Berl.) **9**, 559—570 (1958). — Untersuchungen über die Verteilung natürlicher und strahleninduzierter Chromosomenbrüche bei *Drosophila subobscura*. Chromosoma (Berl.) (im Druck). — Kunze-Mühl, E., E. Müller u. D. Sperlich: Qualitative, quantitative und jahreszeitliche Untersuchungen über den chromosomalen Polymorphismus natürlicher Populationen von *Drosophila subobscura* in der Umgebung von Wien. Z. Vererb.-Lehre **89**, 636—646 (1958). — Kunze-Mühl, E., u. D. Sperlich: Inversionen und chromosomale Strukturtypen bei *Drosophila subobscura*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 65—84 (1955). — Levitan, M.: Experiments on chromosomal variability in *Drosophila robusta*. Genetics **36**, 285—305 (1951). — Mainx, F.: Der chromosomale Strukturpolymorphismus natürlicher Populationen als Problem der Genetik und Evolution. In: Novant'anni delle leggi Mendeliane, S. 425—453. Rom 1956. — Mainx, F., Th. Koske u. E. Smital: Untersuchungen über die chromosomale Struktur europäischer Vertreter der *Drosophila obscura*-Gruppe. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 351—372 (1953). — Richter, H., u. M. Hündler: Die geographische Verbreitung der chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 85—92 (1955). — Rothfels, K.H., and T.W. Fairlie: The non-random distribution of inversion breaks in the midge *Tendipes decorus*. Canad. J. Zool. **35**, 221—263 (1957). — Ruderer, E.: Über den Auslesewert chromosomaler Strukturtypen von *Drosophila subobscura* unter experimentellen Bedingungen. Experientia (Basel) **15**, 9 (1959). — Sperlich, D.: Modellversuche zur Selektionswirkung verschiedener chromosomaler Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 422—436 (1958). — Spiess, E.: Experimental populations of *Drosophila persimilis* from an altitudinal transect of the Sierra Nevada. Evolution **4**, 14—33 (1950). — Relation between frequency and adaptive value of chromosomal arrangements in *Drosophila persimilis*. Evolution **11**, 84—93 (1957). — Wright, S., and Th. Dobzhansky: Genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics **31**, 125—156 (1946).

Dr. Diether Sperlich, Institut für Allgemeine Biologie der Universität Wien, Wien IX (Österreich), Schwarzspanierstraße 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 288—298 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

# GENETISCHE ANALYSE DES ZUSAMMENWIRKENS VON GENOM UND PLASTOM BEI *OENOTHERA**

Von

WILFRIED STUBBE

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 27. Mai 1959)*

RENNER (1922, 1934, 1937) hat gezeigt, daß die Plastiden der Oenotheren erblich verschieden sind. Die Bastarde zwischen verschiedenen Arten sind nicht selten gescheckt, wenn die durch Embryosack *und* Pollen auf die Nachkommen übertragenen Plastiden in Verbindung mit dem Bastardgenom ungleich ergrünungsfähig sind. Das Scheckungsmuster entsteht durch die bei der Zellteilung nach Zufallsgesetzen erfolgende Entmischung der beiden Plastidentypen. Auf Grund der Panaschierung (Variegation) der Artbastarde konnten bisher mit Sicherheit 5 Plastidentypen in der Untergattung *Euoenothera* unterschieden werden.

Um mehr Einblick in das Wesen der genetischen Information der Plastiden zu gewinnen, haben wir uns vorgenommen, die verschiedenen „Plastome" (RENNER 1934) der Wildarten unter gleichen Bedingungen miteinander zu vergleichen. Diese Voraussetzung ist von Natur aus im allgemeinen nicht gegeben; auch bei *Oenothera* sind die Plastomdifferenzen mit Genomdifferenzen verbunden. Die Oenotheren eignen sich jedoch wegen ihrer genetischen Besonderheiten besser als andere Objekte dazu, die verschiedenen Plastidensorten mit einem beliebigen Genom zu kombinieren: Indem man nämlich die Kreuzungen so anlegt, daß die Bastarde komplexheterozygotisch sind, wird eine Vermischung der Genome vermieden und die Umkombination zwischen Genomen und Plastomen auf kürzestem Wege erreicht. Darüber hinaus kann die Unterscheidbarkeit der elterlichen Plastiden stets gesichert werden: Vielfach sind sie durch die Wirkung des Bastardgenoms bereits ungleich ergrünungsfähig. Ist dies nicht der Fall, so wird ein Elter mit mutierten chlorophylldefizienten Plastiden, wie sie in Kultur nicht selten auftreten, markiert.

Unter Beachtung der genannten methodischen Prinzipien haben wir aus 14 Arten (vgl. Tabelle 1) des Oenotherensortiments von Professor O. RENNER, welches sich als weitgehend repräsentativ für die nordamerikanischen Euoenotheren erweist, etwa 400 verschiedene Genom-Plastom-Kombinationen hergestellt, und zwar so, daß jedes Genom möglichst mit allen verfügbaren Plastidentypen und jeder Plastidentyp möglichst mit allen vorhandenen Genomen kombiniert war. Nur etwa ein Drittel der Kombinationen ergab normal ergrünungs-

* Als Habilitationsschrift bei der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln eingereicht.

fähige Pflanzen. Bei den übrigen mehr oder weniger chlorophylldefizienten Phänotypen lassen sich mindestens 10 verschiedene Formen des Defektes unterscheiden, in welchen die Mannigfaltigkeit der (gestörten) Wechselbeziehungen zwischen Genom und Plastom zum Ausdruck kommt.

Tabelle 1. *Übersicht über die zu den Versuchen benutzten Oenothera-Arten*

| Arten | Komplexkombinationen |
|---|---|
| 1. *Oe. ammophila* Focke | *rigens* ♀ · *percurvans* ♂ |
| 2. *Oe. argillicola* Mackenzie | *dilatans* ♀ · *dilatans* ♀ |
| 3. *Oe. atrovirens* Sh. et Bartl. (=*cruciata* Nutt.) | *pingens* ♀ · *flectens* ♂ |
| 4. *Oe. Bauri* Boedijn (=*hungarica* Borbas) | *laxans* ♀ · *undans* ♂ |
| 5. *Oe. biennis* L. aus München | *albicans* ♀ · *rubens* ♀ |
| 6. *Oe. chicaginensis* de Vries | *excellens* ♀ · *punctulans* ♂ |
| 7. *Oe. franciscana* Bartl. | h*franciscana* ♀ · h*franciscana* ♀ |
| 8. *Oe. Hookeri* T. et G. | h*hookeri* ♀ · h*hookeri* ♀ |
| 9. *Oe. Lamarckiana* Ser. | *gaudens* ♀ · *velans* ♀ |
| 10. *Oe. parviflora* L. | *augens* ♀ · *subcurvans* ♂ |
| 11. *Oe. purpurata* Klebahn | h*purpurata* ♀ · h*purpurata* ♀ |
| 12. *Oe. silesiaca* Renner | *subpingens* ♀ · *subcurvans* ♂ |
| 13. *Oe. suaveolens* Desf.* | *albicans* ♀ · *flavens* ♀ |
| 13a *Oe. lutescens* de Vries | *flavens* ♀ · *flavens* ♀ |
| 14. *Oe. syrticola* Bartl. (=*muricata* L.) | *rigens* ♀ · *curvans* ♂ |

* Von *Oe. suaveolens* wurden die Sippen „Standard", „Friedrichshagen", „Fünfkirchen" und „Grado" verwendet (vgl. Stubbe 1953). Im Plastom stimmen alle Sippen überein, während sie im Genom und in den Chromosomenformeln der Komplexe Unterschiede aufweisen.

Ein Vergleich der Plastidensorten der verwendeten 14 Arten in Verbindung mit den verschiedensten „Testgenomen" zeigt, daß in unserem Sortiment das Plastom bei einer Reihe von Arten identisch ist und daß nicht mehr als 5 verschiedene Wildtypen von Plastomen bestehen. Wir bezeichnen dieselben vorläufig als *Hookeri*-Plastom (I), *suaveolens*-Plastom (II), *Lamarckiana*-Plastom (III), *parviflora*-Plastom (IV) und *argillicola*-Plastom (V) (vgl. Tabelle 2).

Vergleicht man die *Genome* bzw. Haploidkomplexe der 14 Wildarten bezüglich ihrer Wirkung auf die Ergrünungsfähigkeit der 5 Plastidentypen, so kann man *nur selten völlige* Übereinstimmung feststellen. Dennoch ist es möglich, die Genome zu Gruppen zusammenzufassen, indem man jedem Grundtyp in seiner Wirkung eine gewisse Variabilität durch modifizierende Gene einräumt. Bei größtmöglicher Vereinfachung zeigen sich nur 3 haploide Grundtypen (A, B, C; vgl. Tabelle 3), welche 6 diploide Genomkombinationen ergeben. Das *Zusammenwirken* der 6 Genotypen mit den 5 Plastidentypen ist in dem Kombinationsrechteck Abb. 1 schematisch dargestellt.

Wir haben die einzelnen Phänotypen durch nur knapp erläuterte Symbole gekennzeichnet, um ein für die nachfolgenden Überlegungen geeignetes einfaches Bezugssystem zur Verfügung zu haben. Auf eine ausführliche Beschreibung der Phänotypen, die ohne Verwendung von farbigen Bildern sehr unvollkommen

ausfallen würde, soll hier verzichtet werden[1]. Die (in Abb. 1) mit gleichem Symbol bezeichneten, aber in verschiedenen Feldern stehenden Typen sind einander nur ähnlich und nicht unbedingt identisch. Die genomabhängige Variabilität des Chlorophylldefektes der ein bestimmtes Feld einnehmenden Kombinationen (z. B. AA/III) wird in dieser Darstellung nur dann durch ein zusätzliches Symbol berücksichtigt, wenn es sich um den Übergang von normal-

Tabelle 2. *Übersicht über die Plastome der geprüften Oenothera-Arten*

| Plastome | *Oenothera*-Arten |
|---|---|
| I | ***Hookeri*** |
| | *franciscana* |
| | *Bauri* (= *hungarica*) |
| II | ***suaveolens*** |
| | *biennis* |
| | *purpurata* |
| III | ***Lamarckiana*** |
| | *chicaginensis* |
| IV | ***parviflora*** |
| | *ammophila* |
| | *atrovirens* |
| | *silesiaca* |
| | *syrticola* (= *muricata*) |
| V | ***argillicola*** |

Tabelle 3. *Einteilung der Genomkomplexe nach ihrer Wirkung auf die Ergrünungsfähigkeit der 5 Plastidentypen*

| Symbol | Genomkomplexe | Angestammtes Plastom |
|---|---|---|
| A | h*franciscana* | I |
| | h*hookeri* | I |
| | *velans* | III |
| | h*purpurata* | II |
| | *albicans* Standard | II |
| | *albicans* Grado | II |
| | *laxans* | I |
| | *punctulans* | III |
| | *rigens* | IV |
| | *undans* | I |
| B | *augens* | IV |
| | *excellens* | III |
| | *flavens* | II |
| | *gaudens* | III |
| | *pingens* | IV |
| | *rubens* | II |
| | *subpingens* | IV |
| C | *curvans* | IV |
| | *dilatans* | V |
| | *flectens* | IV |
| | *percurvans* | IV |
| | *subcurvans* | IV |

grün zu chlorophylldefizient bzw. umgekehrt handelt. Bei den Kombinationen AA/III und AA/IV ist der Chlorophylldefekt an *Hookeri*-ähnliche Genotypen ($A_2A_2$) gebunden; *strigosa*-ähnliche Genotypen ($A_1A_1$) bewirken normale Ergrünung, Übergänge ($A_1A_2$) vermitteln dazwischen.

Da die für unsere Untersuchung verwendeten Arten zum größeren Teil aus Europa stammen (s. RENNER 1942, 1950, 1956), ist noch zu prüfen, wieweit den in Abb. 1 dargestellten Ergebnissen eine allgemeine Bedeutung zukommt. Andere Autoren (CLELAND und HAMMOND 1950, S. 62—66; RENNER 1956, S. 249 bis 252; CLELAND 1958, Tabelle 1) haben schon früher gezeigt, daß die Genome der Arten des Sortiments von RENNER mit denen der nordamerikanischen Euoenotheren, welche CLELAND in 10 Superspezies einteilt, eng verwandt sind. Die Zuordnung der „Renner-Komplexe" zu denen der Superspezies CLELANDs, wie sie uns bei dem augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse vertretbar

[1] Es ist beabsichtigt, eine ausführlichere Beschreibung der chlorophylldefizienten Phänotypen unter Berücksichtigung ihrer Entwicklungsgeschichte und Variabilität später zu veröffentlichen. Dem mit Oenotheren genetisch Experimentierenden sind diese Typen meist aus der Anschauung bekannt.

erscheint, ist aus Tabelle 4 zu ersehen. Diese Zuordnung basiert wesentlich auf der Ähnlichkeit der Komplexe hinsichtlich ihrer allgemeinen phänotypischen

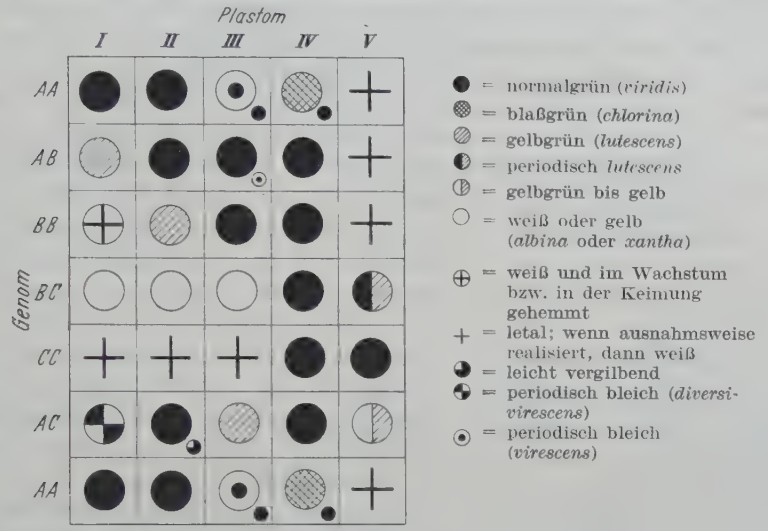



Abb. 1. Kombinationsrechteck, welches eine Übersicht über die Wirkung der einzelnen Genom-Plastom-Kombinationen auf die Ergrünungsfähigkeit der Pflanzen gibt

Wirkung, wie sie in den Arbeiten der Cleland-Schule als *Hookeri-*, *strigosa-*, *biennis-* und *parviflora*-Charaktere unterschieden werden. Außerdem besteht eine teilweise Übereinstimmung in der Segmentanordnung der Chromosomen. Wenn man berücksichtigt, daß der *Hookeri-* und der *strigosa*-Phänotyp, verglichen mit den übrigen, einander sehr ähneln, so ergeben sich bei Zusammenfassung dieser beiden im ganzen ebenfalls 3 Hauptgenotypen, und es zeigt sich, daß diese mit den von uns aus der Wirkung der Genome auf die Ergrünung der Plastidensorten erschlossenen korrespondieren. Tabelle 5 zeigt die Superspezies Clelands in der Schreibweise der Genom-Grundtypen.

Tabelle 4. *Vergleich der Komplexe unseres Materials mit denjenigen der nordamerikanischen Superspezies*

| Grundtypus | „Renner-Komplexe" | Komplexe der Superspezies | Vererbter Phänotyp | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|
| A | h*franciscana* | h*hookeri* | *Hookeri* | $A_2$ |
| | h*hookeri* | h*hookeri* | *Hookeri* | |
| | *velans* | h*hookeri* | *Hookeri* | |
| | h*purpurata* | ? | | |
| | *laxans* | α-*strigosa* | *strigosa* | $A_1$ |
| | *undans* | β-*strigosa* | *strigosa* | |
| | *punctulans* | β-*biennis* I | *strigosa* | |
| | *albicans* | α-*biennis* II | *strigosa* | |
| | *rigens* | α-*parviflora* II | *strigosa* | |
| B | *excellens* | α-*biennis* I | *biennis* | |
| | *rubens* | β-*biennis* II | *biennis* | |
| | *gaudens* | β-*biennis* II | *biennis* | |
| | *flavens* | α, β-*biennis* III oder h*grandiflora* | *biennis* | |
| | *augens* | α-*parviflora* I | *biennis* | |
| | *(sub-)pingens* | α-*parviflora* I | *biennis* | |
| C | *curvans* | β-*parviflora* | *parviflora* | |
| | *flectens* | β-*parviflora* | *parviflora* | |
| | *percurvans* | β-*parviflora* | *parviflora* | |
| | *subcurvans* | β-*parviflora* | *parviflora* | |
| | *dilatans* | h*argillicola* | *parviflora* | |

Soweit wir es bisher an Hand von Literaturangaben und auf experimentellem Wege nachprüfen konnten[1], ergaben sich keine Widersprüche zu dieser Auffassung. Somit erlaubt uns der glückliche Umstand, daß die von uns verwendeten Arten aus dem Sortiment von RENNER hinsichtlich ihrer Genome einen repräsentativen Ausschnitt aus den nordamerikanischen Euoenotheren darstellen, die Ergebnisse der Abb. 1 zu verallgemeinern: Wenn uns durch die Komplexanalyse die Zuordnung einer Art zu einer der Superspezies CLELANDS möglich ist, vereinfacht sich die Identifizierung des mit diesem Genom verbundenen Plastidentyps, da die zu einem Grundtyp gehörenden Genome, was ihr Zusammenwirken mit den Plastomen hinsichtlich der Ergrünungsfähigkeit der Chloroplasten betrifft, sich gegenseitig vertreten können. Auf diese Weise ist es möglich, an Hand der Literaturangaben über Bastardscheckung (CLELAND u. Mitarb. 1950, STINSON 1953) Rückschlüsse über die Identität der Plastiden in den Superspezies der nordamerikanischen Euoenotheren mit den von uns analysierten zu ziehen. Die wahrscheinliche Verteilung der Plastome I—V auf die Superspezies haben wir zusammen mit dem etwas veränderten Clelandschen Stammbaum und unter Einbeziehung der Genom-Grundtypen in Abb. 2 dargestellt.

Tabelle 5. *Darstellung der Superspezies* CLELANDS *durch die Symbole der Grundtypen*

| | |
|---|---|
| 1. *Hookeri*-Gruppe . . . | AA |
| 2. *Elata*-Gruppe . . . . | AA? |
| 3. *Strigosa*-Gruppe . . . | AA |
| 4. *Biennis* I-Gruppe . . | BA |
| 5. *Biennis* II-Gruppe . | AB |
| 6. *Biennis* III-Gruppe . | BB |
| 7. *Parviflora* I-Gruppe . | BC |
| 8. *Parviflora* II-Gruppe . | AC |
| 9. *Grandiflora*-Gruppe . | BB |
| 10. *Argillicola*-Gruppe . . | CC |

Bei den komplexheterozygotischen Bastard-Arten (Gruppe 3—8) entspricht dem ersten Buchstaben der α-Komplex, dem zweiten der β-Komplex.

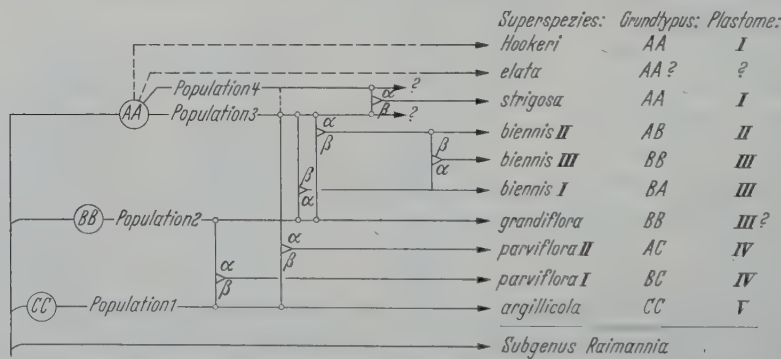



Abb. 2. Kombinierte Darstellung des Genom-Stammbaums der *Euoenotheren* (nach CLELAND 1956, verändert) und der Verteilung der Plastome auf die Superspezies

Außer der Ergrünungsfähigkeit der Plastiden erwiesen sich auch die Keimfähigkeit des Pollens bzw. das Wachstum der Pollenschläuche und die Gestalt der Stärkekörner im Pollen als plastomabhängig[2]. Normal funktionsfähiger

[1] Wir danken Herrn Professor Dr. R. E. CLELAND für die freundliche Überlassung von Samenmaterial.

[2] Bei panaschierten Bastarden zeigte sich, daß die Grenze zwischen den beiden entmischten Plastidensorten mit der Grenze der Pollendifferenz zusammenfällt. Daraus kann man schließen, daß die für letztere verantwortlichen Erbfaktoren nicht im Cytoplasma, sondern in den Plastiden lokalisiert sind. Einzelheiten sollen später mitgeteilt werden.

Pollen besitzt längliche, spindelförmige Stärkekörner; inaktiver Pollen führt Stärkekörner von untypischer, meist runder Form. Diese Pollenmerkmale wurden schon von Renner (1919b) ausführlich untersucht und als von plasmatischen Faktoren abhängig erkannt. Die Differenzen in der Form der Pollen-Stärkekörner sind vermutlich Ausdruck einer Leukoplastendegeneration entsprechend der Chloroplastendegeneration in den Sporophyten bei nicht harmonierender Genom-Plastom-Kombination. Soweit es sich bisher übersehen läßt, bewirken die Kombinationen A/IV, B IV und C/III häufig Inaktivierung des Pollens. Die zu einem Grundtypus (A, B, C) gehörenden Genome reagieren jedoch in bezug auf die Pollenfunktionen nicht immer einheitlich. Von den C-Genomen z. B. geben die Komplexe *curvans*, *subcurvans* und *percurvans* mit Plastom III inaktiven Pollen, während $^{h}$*argillicola*-Pollen *(dilatans)* mit Plastom III normal funktioniert.

Als weiteres plastomkontrolliertes Merkmal sind die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Plastidenvermehrung zu nennen, welche von Schötz (1954) zum ersten Mal ausführlich studiert wurden. Sie äußern sich darin, daß der väterliche Plastidenanteil gegenüber dem mütterlichen in der Nachkommenschaft von Fall zu Fall verschieden ist. Die Erfassung weiterer plastomabhängiger Merkmalsdifferenzen ist wünschenswert, um damit die Voraussetzungen zu schaffen, die Plastomanalyse immer mehr zu vertiefen.

Es ist naheliegend, Vergleiche zwischen dem genetischen Material in den Plastiden und dem im Zellkern zu ziehen. Als erstes erhebt sich die Frage, ob auch das Plastom in funktionelle Untereinheiten zerlegbar ist, und wie solche gegebenenfalls angeordnet sind. Bisher besteht leider keine Aussicht, diese Frage wie beim Zellkern durch Rekombinationsexperimente lösen zu können. Es gibt keinerlei genetische oder zytomorphologische Hinweise auf das Vorhandensein eines Rekombinationsmechanismus in den Plastiden. *Einblick in die Struktur des Plastoms* können wir jedoch in begrenztem Umfange aus der Beobachtung des Mutationsgeschehens erhalten. Man darf annehmen, daß Merkmale, welche unabhängig voneinander mutieren, auf verschiedenen Erbanlagen basieren. Derartige Fälle sind für *Oenothera* beobachtet worden: Nicht selten mutieren die Plastiden in der Weise, daß die Chloroplasten ihre Ergrünungsfähigkeit einbüßen. (Zytomorphologisch stellt man dabei degenerative Veränderungen der Plastidenstruktur fest; der Chlorophyllschwund ist nicht gleichbedeutend mit einem Block in der Chlorophyllsynthese). Es gibt von einer bestimmten Plastidensorte jeweils eine ganze Reihe derartiger Mutanten, die in verschiedenem Grade ausbleichen. Die genauere genetische Analyse der Mutanten hat folgendes ergeben:

1. Der Verlust der normalen Ergrünungsfähigkeit hat sich bei allen bisher bekannten Mutanten als durch die Wildarten-Genome unkompensierbar erwiesen. Dieser Typus von Mutation wäre demnach ein anderer als derjenige, welcher zur Entstehung der Differenzen zwischen den Wildarten-Plastomen geführt hat. Letztere ermöglichen bekanntlich in mindestens einer Genom-Plastom-Kombination normales Ergrünen der Pflanzen. Wir haben deshalb vorgeschlagen (Stubbe 1958), zwischen „Defektmutationen" und „Differenzierungsmutationen" zu unterscheiden[1].

[1] Theoretisch ist es möglich, daß diese Unterscheidung nicht auf grundsätzlichen Differenzen beruht, sondern nur dadurch vorgetäuscht wird, daß uns eine zu begrenzte Auswahl von Genomen zur Verfügung steht.

2. Es wurde festgestellt, daß bei den Defektmutanten die Erbanlagen für die oben beschriebenen Merkmale der Wildtyp-Plastiden unverändert geblieben sind. Nach „Weiß" mutierte Plastiden haben ihre ursprüngliche Vermehrungsgeschwindigkeit beibehalten (SCHÖTZ 1954). Ebenso unterliegen solche Mutanten wie bisher der Genomwirkung bezüglich der Bastardbleichheit, was besonders gut bei gelbgrünen Plastommutanten zu erkennen ist (s. auch RENNER 1937).

Da wir festgestellt haben, daß die Chlorophylldefektmutationen unabhängig von den Merkmalsdifferenzen der Wildarten-Plastome und zusätzlich zu diesen in Erscheinung treten, ist es klar, daß das Plastom aus mindestens zwei verschiedenen funktionellen Untereinheiten besteht. Weitere Aufklärung der Plastomstruktur könnten wir erwarten, wenn uns auch die Beobachtung von Differenzierungsmutationen gelänge. Um sie zu induzieren oder um sie bei spontanem Auftreten aufzufinden, sollte man sich die Erkenntnisse, die uns Abb. 1 vermittelt, zunutze machen: Wie man sieht, werden von den einzelnen Genomen gewisse Plastomdifferenzen und von den verschiedenen Plastomen gewisse Genomdifferenzen toleriert, was das harmonische Zusammenwirken der beiden Partner bei der Entwicklung lebens- und fortpflanzungsfähiger Individuen betrifft. Dabei ist unter Umständen der Toleranzbereich bei den einzelnen Erbträgern ein verschiedener. Plastom IV harmoniert z. B. mit fast allen Genomkombinationen in bezug auf normales Ergrünen, Plastom I oder V dagegen nur mit einer bestimmten, während die anderen Plastome mit zwei oder drei Genomkombinationen harmonieren. Entsprechendes gilt bei umgekehrter Betrachtungsweise für die Harmonie der Genome mit den Plastomen. Differenzierungsmutationen, welche den bereits zwischen den Plastomen der Wildarten bestehenden entsprechen, werden also nur unter ganz bestimmten Genomen als Chlorophylldefekt sichtbar werden und unter anderen Genomen nicht in Erscheinung treten. Dabei muß stets für jede derartige Mutation geprüft werden, ob sie wirklich eine Differenzierungsmutation und nicht eine Defektmutation ist.

Die Erfassung der „faktoriellen Konstitution" des Plastoms würde sich als besonders nützlich für die Beurteilung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den verschiedenen Plastidentypen erweisen. Wir könnten uns z. B. eher eine Aussage darüber erlauben, ob die Differenzen zwischen den einzelnen Plastomen durch einen oder mehrere Mutationsschritte verursacht sind und wie weit Übereinstimmung zwischen den vorhandenen Plastidensorten hinsichtlich ihrer genetischen Information besteht.

Da wir in unseren Kulturen bisher noch keine Differenzierungsmutationen festgestellt haben (die bisherigen Versuche waren nicht auf dieses Ziel abgestimmt), können wir einen annäherungsweisen Plastomvergleich nach der phänotypischen Wirkung der Plastome ausprobieren. Wir gehen dabei von der (nicht unbedingt zutreffenden) Erwartung aus, daß zwei Plastome unter veränderlichen Testbedingungen um so häufiger phänotypisch gleich oder sehr ähnlich reagieren werden, je größere Übereinstimmung hinsichtlich der Erbfaktoren zwischen ihnen besteht. Als geeignete Testbedingungen lassen sich die verschiedenen Kombinationen der Genomgrundtypen A, B, C benutzen. Abb. läßt sich entsprechend auswerten, und wir erhalten unter Mitberücksichtigung der größeren Variabilität unter den A-Genomen folgende tabellarische Zusammen

tellung gleicher phänotypischer Wirkung zwischen je 2 Plastomen (Tabelle 6). n Abb. 3 ist versucht worden, die daraus abzuleitenden Beziehungen zwischen en Plastomen bzw. Ähnlichkeiten im Erbgut bildlich darzustellen. Obwohl wir ns dessen bewußt sind, daß die hier benutzte Methode nur ein Notbehelf ist, verden nachstehende Schlußfolgerungen wahrscheinlich zutreffen: Plastom I hat ie meiste Ähnlichkeit mit Plastom II, weniger mit Plastom III und sehr wenig nit Plastom IV. Große Ähnlichkeit besteht auch zwischen Plastom II und III; iese beiden haben wiederum zu Plastom IV einige Beziehungen. Zwischen Plastom I, II und III einerseits und Plastom V andererseits bestehen große Differenzen, doch hat Plastom V zu Plastom IV eine engere Beziehung.

Es liegt nahe, von der Ähnlichkeit der Plastome auf ihre phylogenetische Verwandtschaft zu schließen und zu fragen, welches Plastom als das ursprüngichste zu gelten hat. Die Rekonstruktion eines Plastiden-Stammbaums läßt sich näherungsweise mit Hilfe des von Cleland (1956, 1958) für die Euoenotheren ntworfenen Stammbaums (vgl. Abb. 2) bewerkstelligen. Da bestimmte Genoypen nur mit bestimmten Plastidentypen harmonieren, besteht ein enger Zuammenhang zwischen der Evolution der Genome und der der Plastome. Wie an sich an Hand von Abb. 1 verdeutlichen kann, war die Differenzierung der Genome und Plastome insofern miteinander gekoppelt, als die Mutation eines er beiden Erbträger nur innerhalb eines Bereiches stattfinden konnte, in welchem das harmonische Zusammenwirken mit dem jeweiligen Partner weiterhin gewährleistet blieb. Wir bevorzugen dabei die Vorstellung, daß die beiden Partner im allgemeinen unabhängig voneinander und nicht gleichzeitig mutierten.

Tabelle 6. *Vergleich der Plastome nach ihrer phänotypischen Wirkung*

| Plastome | Häufigkeit gleicher phänotypischer Wirkung |
|---|---|
| I + II | 3mal |
| I + III | 2—3mal |
| I + IV | 0—1mal |
| I + V | 0mal |
| II + III | 3—4mal |
| II + IV | 2—3mal |
| II + V | 0mal |
| III + IV | 2—3mal |
| III + V | 0mal |
| IV + V | 1mal |

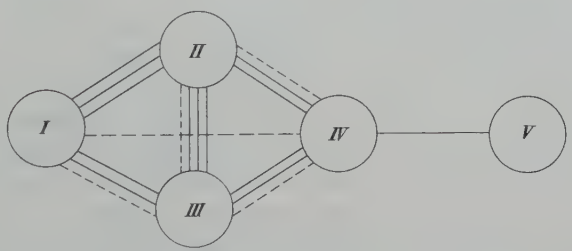



Abb. 3. Graphische Darstellung der Tabelle 6

Entsprechend der Auffassung Clelands, hat das C-Genom als der älteste er heute vorhandenen Genotypen in der Untergattung *Euoenothera* zu gelten. n der homozygotischen *Oe. argillicola* haben wir eine Reliktpopulation dieses Typs vor uns. Das jüngere B-Genom hat sich homozygotisch ebenfalls in einer Reliktpopulation, nämlich in der *Grandiflora*-Gruppe, erhalten. Das A-Genom, ls der jüngste der heutigen Genotypen, finden wir homozygotisch in der *Hookeri*-Gruppe (eventuell auch in der *Elata*-Gruppe) und in etwas anderer Form in den beiden Komplexen der *Strigosa*-Gruppe (vgl. Abb. 2). Als älteste Plastome kommen dementsprechend nur die mit dem CC-Genom harmonierenden Plastome IV und V in Betracht. Ausgehend von der Kombination CC/IV, war die Weiter-

entwicklung zu BB/IV und darüber hinaus zu BB/III möglich. Von derselben Ausgangsposition oder von BB/IV ausgehend konnte die Entwicklung zu $A_1A_1$/IV und weiter zu $A_1A_1$/III, $A_1A_1$/II und $A_1A_1$/I erfolgen. Schließlich konnte sich A in Gegenwart von Plastom II und I zu $A_2$ entwickeln. Wie man sieht, nimmt Plastom IV wenigstens für die Entstehung der Plastome I, II und III wegen seines großen Anpassungsbereichs, der die Genome CC, BB und $A_1A_1$ (einschließlich deren Kombinationen) umfaßt, eine Schlüsselstellung ein. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der gemeinsame Ahn der heutigen Genome mit Plastom IV verbunden war, da dieses für die Genomdifferenzierung im Sinne des Clelandschen Stammbaums zweifellos gute Voraussetzungen bot (offenbar ist die Genomdifferenzierung der Plastomdifferenzierung dabei häufiger vorausgeeilt als umgekehrt).

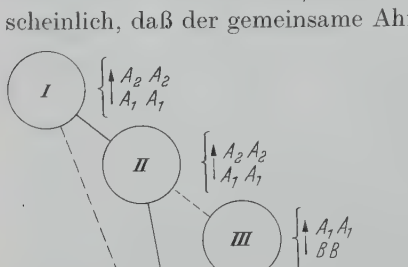



Abb. 4. Hypothetischer Stammbaum der Plastidentypen von *Euoenothera* (I—V), wie er sich ergibt, wenn eine Genomdifferenzierung C→B→$A_1$→$A_2$ im Sinne der von CLELAND angenommenen Populationenfolge zutrifft

Die Ansicht, daß Plastom IV am Anfang der Entwicklung stand, erhält eine wichtige Stütze durch die Auswertung der zwischen den einzelnen Plastidensorten bestehenden Vermehrungsgeschwindigkeitsunterschiede. Dieses Plastidenmerkmal hat — abgesehen davon, daß es sich am Erbträger selbst manifestiert — den Vorzug, daß es anscheinend in allen Fällen, in denen die normale Ergrünung der Pflanzen nicht gestört ist, von Genomdifferenzen weitgehend unbeeinflußt bleibt. Nach den Untersuchungen von SCHÖTZ (1954, 1958) und den an unserem Material von KEMPER (1958) durchgeführten Versuchen lassen sich die Plastidentypen nach ihrer relativen Teilungsfrequenz folgendermaßen anordnen: I > II > III > V > IV. Da also immer dann, wenn unter sonst gleichen Bedingungen zwei sich verschieden schnell teilende Plastidensorten miteinander in Konkurrenz treten, die langsamere von der schnelleren verdrängt wird, muß Plastom IV das ursprünglichste der 5 Plastome sein. Wir kommen also *unabhängig von der Kenntnis der Phylogenie der Genome* zu dem Ergebnis, daß Plastom IV die Basis der Plastomdifferenzierung gewesen sein muß, sofern nicht das Wirksamwerden der Plastidenkonkurrenz, welche auf den Unterschieden in der Teilungsgeschwindigkeit beruht, durch besondere, uns heute noch unbekannte Faktoren ausnahmsweise verhindert wurde. Unter Berücksichtigung der in Abb. 1 und dargestellten Ergebnisse läßt sich nunmehr ein Plastiden-Stammbaum entwerfen, welcher der von CLELAND (1958) angenommenen Populationenfolge gerecht wird, jedoch nicht unbedingt eine solche zur Voraussetzung hat (Abb. 4). Wenn man nur die Ergrünungsfähigkeit der einzelnen Kombinationen berücksichtigt, kommt man mit der Annahme aus, daß sich die Differenzierung lediglich in Gegenwart homozygotischer Genome bzw. von solchen ausgehend abgespielt

hat. Wieweit die Plastomdifferenzierung eventuell aber auch an komplexheterozygotische Genotypen gebunden war, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Dabei dürfte das Studium des Merkmals „plastomabhängige Polleninaktivierung" von Wichtigkeit sein. RENNER (1919a) hat darauf hingewiesen, daß dem Plasma (nach unserer heutigen Meinung ist es das Plastom) bei der Entstehung der Heterogamie der komplexheterozygotischen Arten eine ausschlaggebende Rolle zukommt, indem bestimmte Komplexe bei Überführung in ein fremdes Plasma polleninaktiv werden[1]. Damit gewinnt das Plastom auch von der Haplophase her Einfluß auf die bei den Oenotheren übliche Artbildung durch Bastardierung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Förderung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

## Summary

The plastids of 14 wild species of *Oenothera* were compared with regard to their genetic information (i. e. plastome) under the condition of identical genomes. Five kinds of plastomes are to be distinguished: I *(Hookeri, franciscana, Bauri)*, II *(suaveolens, biennis, purpurata)*, III *(Lamarckiana, chicaginensis)*, IV *(parviflora, ammophila, atrovirens, silesiaca, syrticola)*, V *(argillicola)*. Their phenotypic effects concern the green pigmentation depending on the structure of the chloroplasts, the germination of the pollen or the growth of the pollen tube, the shape of the pollen starch grains, and the rate of multiplication of the plastids.

As far as the genomes are concerned, the haploid complexes of the 14 species investigated can be subdivided into 3 groups (A, B, C) with respect to their cooperation with the plastomes in order to give green pigmentation. These correspond to fundamental types of genomes characterized by morphological features. *A* inherits the "*Hookeri-strigosa*"-phenotype, *B* the "*biennis*"-phenotype, *C* the "*argillicola-β-parviflora*"-phenotype (CLELAND's terminology). Because of the facts, that the 3 types of genomes in our material are the same on which CLELAND's phylogenetical pedigree of *Euoenothera* is based, and that evidently the 5 plastid types of our sortiment comprehend those of the North American species, our results can be regarded as representative for the whole subgenus. With these results it is possible to identify without difficulty any plastome of *Euoenothera*.

As recombinations between different kinds of plastids are unknown, it is necessary for a more detailed analysis of the plastome to study the occurrence of mutations. Spontaneous chlorophyll-deficient plastid mutations did not affect other properties of the wild type, leading to the conclusion that the plastome is composed of more than one functional unit. The occurrence of plastid mutations not affecting the green pigmentation, which should have happened during species differentiation, has not yet been observed in *Oenothera*. Based on CLELAND's ideas concerning the evolution of the present species, a phylogenetic pedigree of the plastid types was developed, considering the adaptation of plastomes and genomes during evolution. Independently the same picture can be derived by comparing the multiplication rate of different kinds of plastids.

[1] Sehr wahrscheinlich sind die Eizellenkomplexe der *parviflora*-Gruppen ursprünglich auf diese Art polleninaktiv geworden.

## Literatur

Cleland, R. E.: Studies in *Oenothera* cytogenetics and phylogeny. Indiana Univ. Publ., Sci. Ser. **16**, 1 (1950). — Chromosome structure in *Oenothera* and its effect on the evolution of the genus. Proc. of the Internat. Genetics Symposia, 1956, Cytologia, Suppl. Vol., S. 3 (1956). — The evolution of the North American oenotheras of the "*Biennis*" group. Planta (Berl.) **51**, 387 (1958). — Cleland, R. E., and B. L. Hammond: An analysis of segmental arrangement in certain races of *Oenothera*. Indiana Univ. Publ. Sci. Ser. **16**, 10 (1950). — Kemper, I.: Untersuchungen an panaschierten Oenotheren-Bastarden mit erblich verschiedenen Plastidensorten. Wiss. Arbeit für das Staatsexamen für das Lehramt an Höheren Schulen, Köln 1958 (unveröffentlicht). — Renner, O.: *Oenothera Lamarckiana* und ihre Bedeutung für die Mutationstheorie und für die Bastardforschung. S.-B. Ges. Morph. Physiol. München **31**, 3 (1919a). — Zur Biologie und Morphologie der männlichen Haplonten einiger Oenotheren. Z. Bot. **11**, 305 (1919b). — Eiplasma und Pollenschlauchplasma als Vererbungsträger bei den Oenotheren. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **27**, 235—237 (1922). — Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. sächs. Akad. Wiss., math.-phys. Kl. **86**, 214—266 (1934). — Zur Kenntnis der Plastiden- und Plasmavererbung. Cytologia, Fujii-Jubiläumsband, 644 (1937). — Europäische Wildarten von *Oenothera*. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 448 (1942). — Europäische Wildarten von *Oenothera*. II. Ber. dtsch. bot. Ges. **63**, 129 (1950). — Europäische Wildarten von *Oenothera* III. Planta (Berl.) **47**, 219 (1956). — Schötz, F.: Über Plastidenkonkurrenz bei *Oenothera*. Planta (Berl.) **43**, 182 (1954). — Beobachtungen zur Plastidenkonkurrenz bei *Oenothera* und Beiträge zum Problem der Plastidenvererbung. Planta (Berl.) **51**, 173—185 (1958). — Stinson, H. T.: Cytogenetics and phylogeny of *Oenothera argillicola* Mackenz. Genetics **38**, 389 (1953). — Stubbe, W.: Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 180 (1953). — Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera* II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. Z. Vererb.-Lehre **89**, 189 (1958).

Dr. Wilfried Stubbe, Botanisches Institut der Universität zu Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 299—334 (1959)

Aus dem Zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich

# BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM EIWEISS-STOFFWECHSEL DER LETALMUTANTE *LETHAL GIANT LARVAE (lgl)* VON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

Ilse Faulhaber

Mit 29 Textabbildungen

*(Eingegangen am 3. April 1959)*

## I. Einleitung und Problemstellung

C. B. Bridges (1933) fand bei *Drosophila melanogaster* eine rezessive Letalmutante, die sich dadurch auszeichnet, daß die homozygoten Larven entweder nicht zur Puparisierung schreiten oder nach verspäteter Puparisierung im Puparium absterben (Pseudopuppen nach E. Hadorn 1937a, b). Die überalterten, letalen Larven können gegenüber normalen wesentlich an Größe zunehmen, weshalb Bridges der Mutation den Namen „*lethal giant larvae*" (*lgl*) gab. Der mutierte Locus liegt am linken Ende des II. Chromosoms (0,0 ±).

In den folgenden Jahren befaßte sich E. Hadorn mit dem Problem der verzögerten oder nicht eintretenden Puppariumbildung. Diese Untersuchungen führten zur Aufklärung der Funktion der Ringdrüse, deren hormonale Tätigkeit die Metamorphose bei Dipteren einleitet (E. Hadorn 1937a, b; B. Scharrer und E. Hadorn 1938; E. Hadorn und J. Neel 1938). Die Ringdrüse ist bei *lgl lgl*-Larven kleiner als bei normalen +/+-Tieren, und ihre Hauptzellen bleiben im Wachstum zurück. Transplantation genetisch normaler Ringdrüsen in *lgl lgl*-Tiere bewirkt dort Beschleunigung der Puparisierung. Aus diesen Befunden schloß Hadorn auf eine Unterfunktion des Organs bei der Letalmutante. Transplantation von *lgl lgl*-Ringdrüsen in normale Wirte ergab, daß die Hauptzellen des Organs irreparabel geschädigt sind, während die auch im Ringdrüsenkomplex liegenden Corpora allata und Corpora cardiaca von *lgl lgl*-Spendern nach der Metamorphose der Wirtstiere gleiche Entwicklungspotenzen haben und gleiche Funktion ausüben wie die der +/+-Tiere (M. Vogt 1947).

Nachdem A. Butenandt et al. (1951) hochaktive Extrakte von Puparisierungshormon herstellen konnten, prüften P. Karlson und G. Hanser (1952) diesen Extrakt bezüglich seiner Wirksamkeit an *Calliphora* und *Drosophila* und stellten durch Injektion fest, daß auch die *lgl*-Mutante auf das Hormon mit Puppariumbildung reagiert.

Während die *lgl*-Ringdrüsen nur in ihrer Entwicklung gehemmt sind, konnten Hadorn (1937b), sowie Hadorn und Gloor (1942) und Gloor (1943) zeigen, daß die Keimzellen der Gonaden bei den letalen Tieren bereits während der Larvenentwicklung degenerieren und sich als Transplantat autonom verhalten. Die Entwicklungspotenzen der weiblichen Keimzellen reichen dabei bis in die frühe Imaginalzeit hinein, die männlichen Keimzellen beginnen dagegen schon im Laufe des 1. Larvenstadiums als Spermatocyten zu degenerieren. Das Gonadensoma differenziert sich im Gegensatz zu den Gameten im genotypisch normalen Wirt vollständig in imaginaler Richtung.

Auch die großen Imaginalscheiben und die Imaginalringe der Speicheldrüsen degenerieren im Laufe des Larvallebens und verhalten sich als Transplantat autophänisch (Hadorn 1955), d.h. sie können sich im genotypisch normalen Wirt nicht in imaginaler Richtung weiterentwickeln (Hadorn 1938; Grob 1952).

Der Darm und die Malpighischen Gefäße der letalen Larven erscheinen völlig normal, während der Imaginalring des Proventrikels irreparabel geschädigt ist und über keine weiteren Entwicklungspotenzen verfügt. Die imaginalen Zellnester des Mitteldarmes können sich als Transplantat noch beschränkte Zeit weiterentwickeln, erreichen die imaginale Differenzierungshöhe jedoch nicht. Der Imaginalring des Hinterdarms ist dagegen in genetisch normalem Milieu durchaus befähigt, ein metamorphosiertes Enddarmstück zu bilden (Grob 1952).

P. S. Chen (1951) untersuchte vergleichend den Sauerstoffverbrauch der 3 Letalmutanten *lgl*, *ltr* und *lme* während der Larven- und Puppenentwicklung. Dabei zeigte sich, daß *lgl* gegenüber normal zunächst einen etwas geringeren aber parallel laufenden $O_2$-Verbrauch aufweist, der aber bei mehr als 5 Tage alten, letalen Larven kontinuierlich abnimmt. Während der Puppenentwicklung hat die Kurve der Atmungsintensität bei normalen Tieren den charakteristischen U-förmigen Verlauf. Sie zeigt dagegen bei den letalen Pseudopuppen keinen aufsteigenden Schenkel, sondern nähert sich mit zunehmendem Puppenalter asymptotisch der Nullgrenze. Dieses Verhalten der letalen Tiere ist verständlich, da bei *lgl*-Pseudopuppen keine imaginale Histogenese einsetzt.

In den folgenden Jahren wurden genphysiologische Studien an Letalfaktoren mehr in biochemischer Richtung betrieben. E. Hadorn und H. K. Mitchell analysierten 1951 erstmals verschiedene Mutanten von *Drosophila melanogaster* papierchromatographisch und stellten unter anderem für den Stamm *letal-translucida* (*ltr*) eine Akkumulation von freien Aminosäuren in der Hämolymphe fest. Mehr in die Einzelheiten gehende, quantitative papierchromatographische und elektrophoretische Untersuchungen an dieser Mutante haben gezeigt, daß ihr Vermögen Eiweiße aus Aminosäuren zu synthetisieren gestört ist (E. Hadorn und E. Stumm-Zollinger 1953; E. Stumm-Zollinger 1954; P. S. Chen 1956; E. Hadorn 1956). Verpuppungsreife Larven der Mutante *ltr* haben 3mal mehr Hämolymphe als normale Larven, und ihre Körperflüssigkeit ist doppelt so konzentriert an freien Aminosäuren und Peptiden als die der Kontrollen. Der Eiweißgehalt der Hämolymphe ist dagegen stark herabgesetzt.

Auch für die Mutante *letal-meander* (*lme*) wurde eine Störung im Proteinstoffwechsel nachgewiesen (Schmid 1949). P. S. Chen und E. Hadorn (1955) konnten zeigen, daß hier zwar die Fähigkeit der Resorption von Aminosäuren vorhanden ist, daß jedoch verfütterte Eiweiße nur in geringem Maße abgebaut werden, da die Proteaseaktivität des Darmes sehr schwach ist.

Kürzlich veröffentlichte R. M. Welch (1957) eine cytochemische Arbeit über den Gehalt an DNS in verschiedenen Geweben der Mutante *lgl* während der Entwicklung. Er fand in allen untersuchten Organen (Speicheldrüse, Ringdrüse, Darmtrakt, Fettkörper, Muskeln und Epidermis) weniger DNS bei letalen als bei normalen Tieren. Ein besonders großer Unterschied zeigte sich bei den Kernen der Speicheldrüsen.

Der Letalfaktor *lgl* ruft ein ebenso reiches Schädigungsmuster hervor wie die beiden Mutationen *ltr* und *lme*. Es erscheint deshalb lohnend zu prüfen, ob die Mutation *lgl* auch in den Eiweißstoffwechsel eingreift, ähnlich wie dies für *ltr* und *lme* nachgewiesen wurde. Die in dieser Arbeit ausgeführten Untersuchungen umfassen folgende Fragen: Welche freien Aminosäuren, Peptide und Eiweißkomplexe sind bei homozygoten *lgl*/*lgl*-Tieren mit unseren Methoden nachweisbar, und wie verhält sich ihr mengenmäßiges Vorkommen im Verlaufe der Larven- und Puppenentwicklung? Die an *lgl*/*lgl*-Tieren gewonnenen Versuchsergebnisse werden mit denjenigen von *lgl*/*Cy* Kontrolltieren verglichen, die als Geschwister der Letalen in der gleichen Zuchtschale aufwachsen und in bezug auf den Eiweißstoffwechsel kaum wesentlich vom Wildtyp abweichen.

## II. Material und Methoden

### *1. Zucht*

Der im II. Chromosom gelegene Letalfaktor *lgl* wurde als balanciertes System über einem *Cy*-Chromosom bei 25° C auf Standardfutter gezüchtet. *Cy*/*Cy*-Individuen sterben nach Vollendung der Embryonalentwicklung, *lgl*/*lgl*-Tiere erreichen höchstens das Pseudopuppenstadium; so können die *lgl*/*Cy* Heterozygoten inter se gekreuzt werden, ohne daß der *lgl*-Faktor verloren geht. Das Chromosom, welches die Mutation *lgl* trägt, wurde mit den Faktoren *cn* und *bw* markiert. Die heterozygoten Zuchttiere haben also den Genotypus *lgl cn bw*/*Cy*. Sie können vom 3. Larvenstadium an auf Grund ihrer gelben Malpighischen Gefäße von den letalen *lgl cn bw*/*lgl cn bw*-Tieren mit farblosen Malpighischen Gefäßen unterschieden werden. Der Kürze halber werden die beiden zu vergleichenden Genotypen in dieser Arbeit mit den Gensymbolen *lgl*/*lgl* bzw. *lgl*/*Cy* bezeichnet.

Für die papierchromatographischen Untersuchungen benötigt man eine Anzahl Tiere annähernd gleichen Alters. Es wurden zu diesem Zweck 20—25 Fliegenpaaren in Intervallen von 2 Std Futterschälchen zur Eiablage bereitgestellt. Das Alter der Gelege ist somit auf

± 1 Std genau bestimmbar. Die belegten Schälchen wurden in große Futterschalen übertragen und dort für die Bestimmungen entnommen.

### 2. *Papierchromatographie*

Für die qualitativen und quantitativen Untersuchungen der freien Aminosäuren und Peptide im Körperextrakt waren zur Herstellung eines zweidimensionalen Chromatogrammes 10 Larven bzw. 20 Puppen nötig. Die den Zuchtschalen entnommenen Tiere wurden in Aqua dest. gewaschen, mit Filtrierpapier abgetrocknet und in einem Glasröhrchen homogenisiert. Die Abtrennung des Körpereiweißes erfolgte durch Extraktion mit 40 mm³ 80%igem Methanol und durch nachfolgendes Zentrifugieren. Die überstehende Flüssigkeit wurde auf Whatman I-Filtrierpapier (28 × 46 cm) aufgetragen. Die Methode der zweidimensionalen Papierchromatographie von Aminosäuren wurde den Arbeiten von Boissonnas (1950), Brush und Mitarbeitern (1951), Auclair und Dubreuil (1953) entnommen und die Nachweisreaktion für freie Aminosäuren und Peptide nach Wieland und Kawerau (1951), Bode und Mitarbeitern (1952) Fischer und Dörfel (1953), sowie Benz (1955) modifiziert. Die Chromatogramme wurden in der 1. Dimension aufsteigend in 70%igem Propanol und absteigend in der 2. Dimension in wassergesättigtem Phenol bei Zimmertemperatur entwickelt, getrocknet und mit einer 0,5%igen Lösung von Ninhydrin in absolutem Alkohol beidseitig besprüht. Die blau-violett oder gelb gefärbten Flecken der Ninhydrin-positiven Substanzen wurden durch anschließende Erwärmung der Chromatogramme auf 60° C sichtbar gemacht.

Zum Nachweis von *Kynurenin* und *Tryptophan* wurde Ehrlichs Reagenz (Herstellung vgl. Cramer 1953) verwendet. *Dopa* wurde mit $FeCl_3$ nachgewiesen (Turba 1954) und *schwefelhaltige Aminosäuren* mit Feigls Azid-Jod-Reagenz (Block 1952).

Für die quantitativen Bestimmungen auf zweidimensionalen Chromatogrammen wurde der Flächeninhalt der Flecken planimetriert, um die Blindwertskorrektur des Chromatographierpapiers berechnen zu können. Die Eluierung der Flecken erfolgte in einer sauren Methanol-$Cu(NO_3)_2$-Lösung (500 cm³ Methanol, 2 cm³ gesättigte, wäßrige $Cu(NO_3)_2$-Lösung und 0,2 cm³ 10%ige $HNO_3$). Dabei färbt sich der blau-violette Ninhydrin-Aminosäurekomplex rot durch Einlagerung des $Cu^{++}$-Ions. Diese rote Farbe ist im Gegensatz zu der des Ninhydrin-Aminosäurekomplexes längere Zeit stabil. Die Farbflecken und eine Papierblindprobe bekannten Flächeninhaltes vom gleichen Chromatogramm wurde herausgeschnitten und in Reagenzgläsern mit 5 cm³ Eluierlösung übergossen. Nach frühestens 2 Std konnte die photometrische Bestimmung der Extinktionswerte mit dem Beckman-Spektrophotometer (DU) bei konstanter Wellenlänge von 510 m$\mu$, der Wellenlänge maximaler Absorption des roten Farbstoffes, vorgenommen werden.

Zur Bestimmung der Gesamtmenge an Ninhydrin-positiven Substanzen in der Hämolymphe wurden für ein eindimensionales Chromatogramm 2,4 mm³ Körperflüssigkeit verwendet. Die Epidermis der Larven wurde unter Schonung des Darmes mit feinen Nadeln aufgerissen und die herausfließende Hämolymphe mit einer geeichten Mikropipette aufgesaugt. Die Körperflüssigkeit wurde mit Aqua bidest. 10fach verdünnt und zur Ausfällung der vorhandenen Eiweiße $^1/_2$ min im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Chromatogramme wurden in 70%igem Propanol aufsteigend entwickelt und die freien Aminosäuren und Peptide mit Ninhydrin nachgewiesen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Chromatogramme in gleichgroße Streifen zerlegt, die jeweils die Flecken einer Einzelbestimmung enthielten. Als Kontrolle für jedes Chromatogramm wurde ein Blindwertsstreifen untersucht. Die Farbe der Ninhydrin-positiven Substanzen eines jeden Papierstreifens wurde mit 10 cm³ Methanol-Kupfernitrat-Lösung eluiert.

Für die Untersuchung der einzelnen freien Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe wurden zweidimensionale Chromatogramme unter Verwendung von 13,8 mm³ Blut nach der in diesem Abschnitt beschriebenen Methode hergestellt.

### 3. *Papierelektrophorese*

Die Untersuchungen über den Eiweißgehalt der Hämolymphe wurden an gleichaltrigen Larven aus 4stündigen Gelegen durchgeführt. Für die quantitative Analyse wurden jeweils pro Elektropherogramm 16,55 mm³ Flüssigkeit verarbeitet; die entsprechende Technik wurde

in den Arbeiten von Chen (1956), Wunderly (1953) und Wunderly und Gloor (1953) ausführlich beschrieben. Chen (1956) konnte die durch Tyrosinasewirkung hervorgerufene Melanisierung der Hämolymphe bei seinen elektrophoretischen Untersuchungen durch KCN-Behandlung weitgehend verhindern. Durch Zusatz von 2 $cm^3$ 10%iger reiner HCl erhöhte ich die inaktivierende Wirkung des KCN auf die Tyrosinase der Hämolymphe. Außerdem setzte ich die auf Filtrierpapier aufgetragene Substanz ein zweites Mal 1 Std lang der HCN-Atmosphäre aus. Zur Durchführung der elektrophoretischen Bestimmungen benützte ich die gleiche Apparatur, die Chen 1956 zur Verfügung stand. Der Nachweis der Eiweiße erfolgte mit Bromphenol-blau, und die quantitativen Bestimmungen wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer (DU) bei der Wellenlänge maximaler Absorption des blauen Farbstoffes von 595 m$\mu$ ausgeführt.

## III. Qualitative und quantitative papierchromatographische Analyse der freien Aminosäuren und Peptide

### *1. Wahl der Altersabstände*

Die beiden Genotypen *lgl/lgl* und *lgl/Cy* sind erst vom mittleren 3. Larvenstadium an eindeutig voneinander unterscheidbar. Deshalb wurde die 1. Messung willkürlich an Tieren vorgenommen, die das Alter von 87 Std, vom Zeitpunkt der Eiablage an gerechnet, hatten. Die 2. Messung erfolgte 12 Std später, und alle weiteren Untersuchungen an *lgl/lgl*-Larven wurden in Abständen von 24 Std durchgeführt. Die Analyse der Puppenstadien wurde an *lgl/lgl*-Tieren und Kontrollen in gleichem entwicklungsphysiologischen Alter durchgeführt, d.h. an Tieren, die sich in vergleichbaren Entwicklungsphasen befanden. Eine morphologisch deutlich ausgeprägte Phase liegt zum Zeitpunkt der Puppariumbildung vor. Es wurden zunächst Tiere innerhalb der 1. Std nach der Puparisierung verwendet (farblose Chitinhülle). Eine 2. Bestimmung wurde an etwa 24 Std älteren Puppen bzw. Pseudopuppen vorgenommen (vollständig ausgefärbtes und gehärtetes Puparium). Das Alter der heterozygoten, ungefärbten Vorpuppen schwankte zwischen 105,5 $\pm$ 1,5 Std, dasjenige der Puppen für die 2. Versuchsserie zwischen 124,5 $\pm$ 2,5 Std. Die Pseudopuppenbildung bei *lgl/lgl*-Tieren setzt nicht einheitlich in einem genau fixierten Zeitpunkt ein (Hadorn 1938), deshalb sind hier die Altersschwankungen viel größer als bei den Kontrollen. Verwendete farblose Pseudopuppen waren 8—13 Tage, ausgefärbte Pseudopuppen 9—11 Tage alt.

### *2. Qualitative Bestandsaufnahme im Körperextrakt und in der Hämolymphe*

Im Rahmen dieser Arbeit schien es zunächst erforderlich, die drei folgenden Fragen zu klären, soweit dies nach der auf S. 301 beschriebenen papierchromatographischen Methode möglich ist: Sind generell bei *lgl/lgl*-Tieren und *lgl/Cy*-Kontrollen die gleichen freien Aminosäuren und Peptide vorhanden? Unterscheiden sich *Larvenhämolymphe* und *Larvenextrakt* in der Zusammensetzung ihrer Ninhydrinpositiven Substanzen? Ändert sich der Bestand an freien Aminosäuren und Peptiden im Körperextrakt während der *Puparisierung*? Tabelle 1 gibt über diese Fragen Auskunft.

*lgl/lgl*-Tiere und ihre Kontrollen enthalten die gleichen Ninhydrin-positiven Substanzen mit Ausnahme des Flecks „*Marine-blau*". Diese Substanz, die noch nicht identifiziert werden konnte, steigt in der ersten Dimension (Propanol) so hoch wie Valin und hat in der zweiten Dimension (Phenol) fast den gleichen $R_f$-Wert wie Prolin. Mit Ninhydrin färbt sie sich kräftig marine-blau an und behält den gleichen Farbton nach Behandlung mit $Cu(NO_3)_2$-Reagenz bei. Auf Grund dieses Verhaltens ist sie von den anderen freien Aminosäuren und Peptiden leicht unterscheidbar.

*Larvenhämolymphe* unterscheidet sich bezüglich ihrer Ninhydrin-positiven Stoffe qualitativ sehr wenig von *Larvenextrakt*. Die *Peptide 1 und 2* werden bei

Verarbeitung von *Hämolymphe* besser voneinander getrennt als bei Untersuchung von *Körperextrakt*. *Tryptophan*, *Kynurenin*, *Dopa* und „*Marine-blau*" sind nur *im Körperextrakt* nachweisbar. Dagegen findet man *Ornithin*, die *Substanz „Z"* und einen Fleck, der vielleicht dem *Cystin* oder *Lanthionin* entspricht ($R_f$ 0,26 in Phenol), nur in *Hämolymphe*.

Tabelle 1. *Nachgewiesene freie Aminosäuren und Peptide*

+ = In meßbaren Mengen vorhanden, (+) = nur in Spuren nachweisbar, — = nicht nachweisbar. Die eingeklammerten Namen der Peptide wurden teils von Hadorn und Mitchell (1951), teils von Benz (1955) verwendet.

| Aminosäuren und Peptide | Larvenhämolymphe | | Larvenextrakt | | „Puppen"Extrakt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *lgl/lgl* | *lgl/Cy* | *lgl/lgl* | *lgl/Cy* | *lgl/lgl* | *lgl/Cy* |
| *Peptid 1 (Larvin 1)* | + | + | + (1) | + (1) | (+) | (+) |
| *Peptid 2 (Larvin 2)* | + | + | + (1) | + (1) | (+) | (+) |
| *Peptid 3 (Metamorphin)* | + | + | + | + | + | + |
| *Peptid 4 (Drosophilin)* | + | + | + | + | + | + |
| *Asparaginsäure* | + | + | + | + | + | + |
| *Glutaminsäure* | + | + | + | + | + | + |
| *Serin* | + | + | + | + | + | + |
| *Taurin* | + (2) | + (2) | + (2) | + (2) | + (2) | + (2) |
| *Glycin* | + | + | + | + | + | + |
| *Threonin* | + | + | + | + | + | + |
| *α-Alanin* | + | + | + | + | + | + |
| *Tyrosin* | + | + | + | + | + (3) | + (3) |
| *β-Alanin* | (+) | (+) | (+) | (+) | + | + |
| *Glutamin* | + | + | + | + | + | + |
| *Ornithin* | + | + | (+)(4) | (+) (4) | — | — |
| *Lysin* | + | + | + | + | + | + |
| *Arginin* | + | + | + | + | + | + |
| *Histidin* | + | + | + | + | + | + |
| *Prolin* | + | + | + | + | + | + |
| *Valin* | + | + | + | + | + | + |
| *Leucin* | + | + | + | + | + | + |
| *γ-Aminobuttersäure* | + | + | + | + | + | + |
| *Tryptophan* $R_f$ 0,78 | — | — | (+) | (+) | + | + |
| *Kynurenin* $R_f$ 0,84 | — | — | (+) | (+) | (+) | + |
| *Gelb (Dopa)* $R_f$ 0,53 | — | — | — | (+) (5) | + (3) | + (3) |
| *Marineblau* $R_f$ 0,90 | — | — | — | — | — | + (6) |
| *Cystin* oder *Lanthionin?* $R_f$ 0,26 | + | + | — | — | — | — |
| „*X*" $R_f$ 0,20 | + (7) | + (7) | + (7) | + (7) | — | (+) |
| „*Z*" $R_f$ 0,45 | — | — | + (8) | + (8) | — | — |

Angegebene $R_f$-Werte beziehen sich auf wassergesättigtes Phenol als Laufmittel. (1) Beide *Peptide* nicht deutlich voneinander getrennt, deshalb bei quantitativen Untersuchungen gemeinsam bestimmt. (2) Regelmäßiges Auftreten bei verpuppungsreifen Larven und bei Puppen. (3) Nur bei noch nicht ausgefärbten Vorpuppen bzw. Pseudopuppen auftretend. (4) Nicht immer scharf von Lysin getrennt. (5) In Spuren bei verpuppungsreifen Larven vorhanden. (6) Tritt nur auf bei Pseudopuppen, die mindestens 18—24 h zuvor ein Puparium gebildet haben. (7) Schließt dicht an *Peptid 2* an, mitunter wird keine scharfe Trennung der beiden Flecken erreicht, der Fleck wurde deshalb bei quantitativen Untersuchungen in die Werte von *Peptid 1* und *2* einbezogen. $R_f$ (Phenol) ~ *Glutaminsäure*. (8) Nur sehr selten im Extrakt viertägiger Larven gefunden.

Die einzelnen freien Aminosäuren und Peptide bei *Drosophila melanogaster* wurden z. T. schon früher von verschiedenen Autoren beschrieben. Die *Peptide 1, 2, 3 und 4* wurden von Hadorn und Mitchell (1951) nachgewiesen. *Asparagin-*

*säure, Glutaminsäure, Serin, Taurin, Glycin, Threonin, α-Alanin, Tyrosin, β-Alanin, Glutamin, Ornithin, Lysin, Arginin, Histidin, Prolin, Valin, Leucin und γ-Aminobuttersäure* wurden von Auclair und Dubreuil (1953), Stumm-Zollinger (1954), Chen und Hadorn (1954) und Benz (1955) auf zweidimensionalen Chromatogrammen identifiziert. Diskrepanzen zwischen den eigenen und den Ergebnissen von Auclair und Dubreuil wurden von Stumm-Zollinger (1954) eingehend diskutiert.

Die *Substanz „X"* konnte oft gut von *Peptid 2* getrennt werden, auf eine Identifizierung wurde verzichtet.

Die *Substanz „Z"* wurde nur in wenigen Fällen in geringen Mengen im Extrakt 4 Tage alter Larven gefunden. Sie hat in Propanol etwa den gleichen $R_f$-Wert wie das *Peptid 4*.

Während der *Puppariumbildung* von *Drosophila melanogaster* ändert sich die Zusammensetzung des *Körperextraktes* bezüglich der freien Aminosäuren und Peptide. Es treten einige weitere Substanzen auf, die Ninhydrin-positiv reagieren.

*Tryptophan* und *Kynurenin* treten auf zweidimensionalen Chromatogrammen in meßbaren Mengen erstmals bei jungen Puppen auf (Tabelle 3). Die eisblaue Fluoreszenz des *Kynurenins* ist aber bereits auf zweidimensionalen Chromatogrammen 4tägiger Larven in UV-Licht sichtbar. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen, die Egelhaaf (1957) über den papierchromatographischen Nachweis von *Kynurenin* bei *Ephestia kühniella* und Pryor (1955) bei *Calliphora erythrocephala* veröffentlichten. Der erste mikrochemische Nachweis von *Kynurenin* bei *Drosophila*-Puppen gelang H. Kikkawa (1941).

Zum Nachweis wurden ein- und zweidimensionale Chromatogramme mit den allgemein in dieser Arbeit verwendeten Laufmitteln entwickelt und als Farbreagenz p-Dimethylaminobenzaldehyd benutzt. Die kräftige Orangefarbe des *Kynurenins* tritt bereits auf noch feuchten, frisch besprühten Chromatogrammen in Erscheinung. *Tryptophan* färbt sich nach kurzfristiger Trocknung der Chromatogramme bei 60° C hellgelb, zuweilen auch violett, je nach der vorhandenen Menge. Zur Überprüfung der $R_f$-Werte wurde auf eindimensionalen Chromatogrammen Puppenextrakt mit synthetischem *Kynurenin* und *Tryptophan* verglichen und Übereinstimmung der Wanderungsgeschwindigkeit festgestellt. Durch Zusatz von synthetischem *Kynurenin* und *Tryptophan* zu Puppenextrakt konnte außerdem gezeigt werden, daß sich die Flecken, die den beiden Substanzen entsprechen, auf zweidimensionalen Chromatogrammen verstärken.

*„Gelb" (Dopa):* Bei heterozygoten Vorpuppen bzw. letalen Pseudopuppen mit noch farbloser Chitinhülle tritt auf zweidimensionalen Chromatogrammen eine Substanz auf, die sich mit Ninhydrin gelb färbt. Sie hat bei Verwendung von Propanol als Laufmittel in der ersten Dimension den gleichen $R_f$-Wert wie Serin und erscheint in der Laufrichtung des Phenols in der zweiten Dimension unscharf streifenförmig mit $R_f$-Werten zwischen 0,35—0,53. Bei Vorpuppen und Pseudopuppen mit pigmentiertem Puparium ist sie nicht mehr nachweisbar. Es lag deshalb nahe anzunehmen, daß diese Substanz mit der Ausfärbung des Puppariums in Zusammenhang stehe, und daß es sich um eine dem Tyrosin verwandte Verbindung handele (Wigglesworth 1957, Richards 1958). M. Pryor (1955) wies in reifen Larven von *Calliphora erythrocephala* und *Lucilia caesar* papierchromatographisch geringe Mengen von *Dopa* mit Ferrichlorid nach, und E. Stumm-Zollinger (1954) erwähnt in ihrer Arbeit über die Mutante *ltr*, daß

*Dopa* eventuell mit dem *Peptid 3* verwechselt werden könnte, da sich beide Substanzen mit Ninhydrin gelb färben und ähnliche $R_f$-Werte haben.

Ich prüfte deshalb zunächst das Vorhandensein von *Dopa* mit den $FeCl_3$-Reagenz auf eindimensionalen Chromatogrammen, die mit 70%igem Propanol entwickelt wurden. Die charakteristische fahlgrün-blaue Farbe, die reines *Dopa* mit $FeCl_3$ ergibt, trat in den Chromatogrammen beider Genotypen mit dem gleichen $R_f$-Wert wie die aus reinem Dopa bestehende Vergleichslösung auf. Phenol ist als Laufmittel für eindimensionale Chromatogramme zum Nachweis von *Dopa* ungeeignet, weil es oxydierend wirkt und auf den Chromatographierpapier einen schwarzen Streifen hinterläßt. Bei Herstellung von zweidimensionalen Chromatogrammen zeigte sich, daß reines *Dopa* in größerer Konzentration einen blau-violetten Flecken mit Ninhydrin ergibt, der fast die gleichen $R_f$-Werte in beiden Laufrichtungen hat wie Serin. Außerdem bildet es einen hellgelben Schwanz, der sich in der Laufrichtung des Phenols über die blauvioletten Flecken des *Taurins* und des *Threonins* bis in die Lücke hinzieht, die die 3 Substanzen *Threonin*, α-*Alanin* und *Glutamin* zwischen sich entstehen lassen. Dieser Tatbestand wird auf Chromatogrammen, die 24 Std nach der Entwicklung mit Ninhydrin betrachtet werden, besonders deutlich.

Ein Test zum Nachweis *schwefelhaltiger Aminosäuren* mit Feigls Azid-Jod-Reagenz verlief bei 4 Tage alten Larven beider Genotypen positiv. Dieser Test beruht darauf, daß Jodlösung in saurem Medium aus SH-Gruppen unter Entfärbung elementaren Schwefel freisetzt. Auf eindimensionalen, mit 70%igem Propanol bzw. Butanol-Eisessig-Wasser (Verhältnis 40 : 10 : 10) entwickelten Chromatogrammen erschienen bei Letalen und Kontrollen drei entfärbte Stellen auf dem hellbraunen Grund des Papiers. Die $R_f$-Werte dieser Flecken entsprechen etwa denen der *Peptide 3* und *4* und des *Methionins*. *Peptid 3* enthält nach G. Benz (1955) geringe Mengen *Cystein*. E. Stumm-Zollinger (1954) konnte bei der Mutante *ltr* *Cystin* nachweisen. Sie schreibt, daß diese Substanz in nächster Nähe von *Peptid 4* liegt. Dies würde auch mit den Befunden dieser Arbeit an Larvenhämolymphe übereinstimmen, denn in der Nachbarschaft von *Peptid 4* und *Glutaminsäure* liegt auf zweidimensionalen Chromatogrammen eine weitere Ninhydrin-positive Substanz ($R_f$ 0,26 in Phenol). Auf ihre Identifizierung wurde verzichtet.

### *3. Das Verhalten der Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen während der Entwicklung*

**a) Vergleich zwischen Körperextrakt und Hämolymphe.** Die Befunde für *Körperextrakt* beziehen sich in jedem untersuchten Altersstadium auf die in einer konstanten Anzahl von Tieren vorhandene Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen (Abb. 1). Die Bestimmungen an *Hämolymphe* gelten dagegen für die Konzentration der Ninhydrin-positiven Substanzen in einem gegebenen Volumen Körperflüssigkeit (Abb. 2a und b). Die papierchromatographische Technik wurde auf S. 301 ausführlich beschrieben. In Abb. 1 entspricht jeder Kurvenpunkt der Summe der Extinktionen der einzelnen freien Aminosäuren und Peptide auf einem zweidimensionalen Chromatogramm. Abb. 2a wurde direkt auf Grund von Messungen des Totals der Ninhydrin-positiven Substanzen auf eindimensionalen Chromatogrammen gewonnen. Abb. 2b ist wiederum das Ergebnis der Summierung von Einzelextinktionen auf zweidimensionalen Chromatogrammen. Abb. 2a zeigt im Vergleich zu Abb. 2b bei Larven im Alter von 3—4 Tagen etwas kleinere Differenzen zwischen *lgl*/*lgl*-Tieren und *lgl*/*Cy*-Kontrollen.

Während der Durchführung der Versuche, die in Abb. 2a veranschaulicht sind, waren die Temperaturschwankungen des Zuchtthermostaten relativ groß und dürften hauptsächlich für die Streuung der Meßwerte bei jüngeren Larven bis zum Alter von 4 Tagen verantwortlich sein. Als Fehlerquelle für überalterte *lgl*/*lgl*-Larven kommt weniger die Variabilität der Entwicklungsgeschwindigkeit in Betracht, weil diese Tiere einen reduzierten Baustoffwechsel zu haben scheinen (vgl. S. 319), sondern vielmehr die Beschaffenheit des Futters. Die Hefe

verdarb häufig, nachdem die normalen Tiere ins Puppenstadium eingetreten waren, und die *lgl/lgl*-Larven mußten auf frisches Futter umgesetzt werden.

Allgemein sinkt die Menge der Ninhydrin-positiven Stoffe sowohl im *Körperextrakt* als auch in der *Hämolymphe* im Verlaufe der Entwicklung vom späten 3. Larvenstadium bis zur Bildung des Puppariums bei *lgl/lgl*-Tieren und Kontrollen (Abb. 1, 2a und b). Die gleiche Beobachtung machten HADORN und STUMM-ZOLLINGER (1953) an *Drosophila*-Larven des Genotyps *ltr*/+ bezüglich der *Hämolymphe* und BENZ (1955) an Wildtieren für *Körperextrakt*. Die Bestimmungen an *Hämolymphe* zeigen bei *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Genotypen geringere Unterschiede als die an *Körperextrakt*. Die Konzentration der Eiweißbausteine pro Volumeneinheit *Hämolymphe* ist bei 77—104 Std alten *lgl/lgl*-Larven nur wenig höher als bei Kontrollen desselben Alters. Sie sinkt bei überalterten *lgl/lgl*-Larven tiefer als bei verpuppungsreifen heterozygoten Kontrollen. Die Meßkurven für *Körperextrakt* zeigen bei *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Tieren starke Unterschiede. Die Meßwerte für Heterozygote fallen sukzessive ab bis zum Zeitpunkt der Puparisierung. Die Extinktionswerte für *lgl/lgl*-Tiere steigen zunächst erheblich an und erreichen ein Maximum bei 5 Tage alten Larven. Sie sinken bei noch älteren Letalen ab und erreichen bei etwa 8tägigen Larven das Niveau verpuppungsreifer, heterozygoter Tiere. Bei mehr als 8 Tage alten *lgl/lgl*-Larven bleibt die Menge der Ninhydrin-positiven Stoffe im *Körperextrakt* praktisch unverändert hoch. Während der Pseudopuppenbildung sinkt sie etwa auf das Niveau, welches entwicklungsphysiologisch gleich alten heterozygoten Puppen entspricht. *lgl/lgl*-Larven, die das Alter von 4 Tagen überschreiten, reichern *Körperflüssigkeit* an (Tabelle 2). Vielleicht steht dieser Prozeß in Zusammenhang mit dem temporär erhöhten Gehalt an freien Eiweißbausteinen im *Körperextrakt* letaler Tiere.

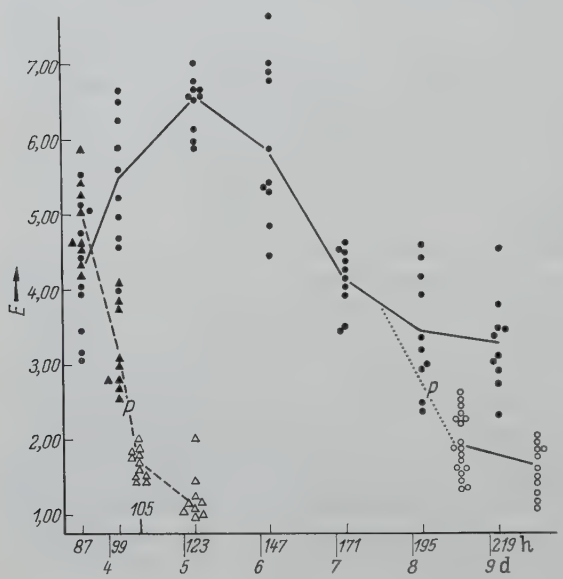



Abb. 1. Gesamtmenge aller Ninhydrin-positiven Substanzen im *Körperextrakt* gewonnen aus einer konstanten Anzahl von Tieren (10 Larven bzw. 20 Puppen). Die Meßwerte sind in Extinktionseinheiten (Ordinate) angegeben. Die Werte für Puppenstadien wurden nachträglich durch 2 dividiert. Die Abszisse bezeichnet das Alter der Versuchstiere vom Zeitpunkt der Eiablage an gerechnet in Stunden (h), darunter ist zur leichteren Orientierung die entsprechende Einteilung in Tagen angegeben (d). —●— *lgl/lgl*-Larven, —○— *lgl/lgl*-Pseudopuppen, - -▲- - *lgl/Cy*-Larven, - -△- - *lgl/Cy*-Puppen. Die Symbole bezeichnen Einzelmessungen. Ihre Mittelwerte ergeben sich aus dem Kurvenverlauf. Das Zeichen *P* gibt den Zeitpunkt der Puparіumbildung an.
Weitere Erläuterungen auf S. 305

**b) Vergleich zwischen den beiden Mutanten *lgl* und *ltr*.** Die Anomalie im Aminosäurestoffwechsel wirkt sich bei den beiden Letalstämmen in verschiedener Weise aus. Bei Betrachtung der graphischen Darstellungen für die Messungen an

*Körperextrakt* (HADORN und STUMM-ZOLLINGER 1953) fällt auf, daß *ltr/ltr*-Individuen nicht den charakteristischen Konzentrationsabfall der freien Aminosäuren

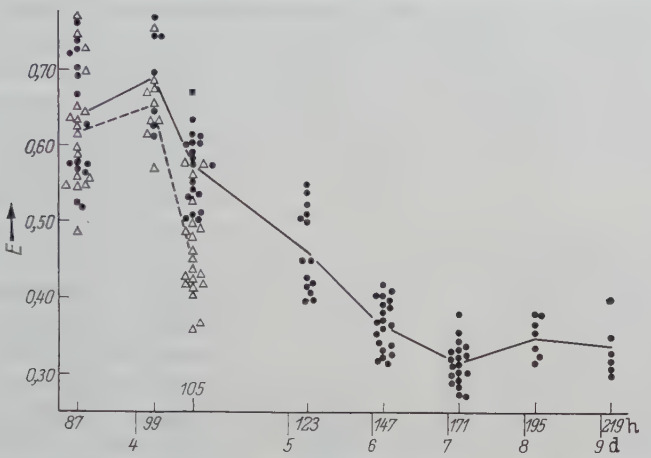



Abb. 2a. Konzentration der gesamten Ninhydrin-positiven Stoffe in 2,4 mm³ *Hämolymphe*. Ordinate: Farbextinktion, Abszisse: Larvenalter in Stunden (h) und Tagen (d). —●— *lgl/lgl*-Larven, --△-- *lgl/Cy*-Larven. Weitere Erläuterungen auf S. 305

und Peptide beim Herannahmen der Verpuppungsreife zeigen wie *lgl/lgl*-Tiere (Abb. 1). Allerdings ist zu berücksichtigen, daß E. STUMM-ZOLLINGER nicht mit Methanolextrakt arbeitete, sondern je 1 Tier für die Einzelmessungen direkt auf dem Startpunkt des Chromatogramms zerquetschte, nachdem sie es vorher zur

Tabelle 2. *Anzahl benötigter Larven zur Gewinnung von 16,55 mm³ Hämolymphe*

d = Tage, h = Stunden, n = Anzahl der Bestimmungen. Es sind die Durchschnittswerte und deren mittlere Fehler angegeben

| Alter | n | Anzahl der *lgl/lgl*-Larven | n | Anzahl der *lgl/Cy*-Larven |
|---|---|---|---|---|
| 3 d 4 h | 9 | 99,3 ± 6,7 | 9 | 73,3 ± 4,9 |
| 4 d | 7 | 51,0 ± 2,9 | 7 | 75,1 ± 4,6 |
| 5 d | 7 | 25,6 ± 2,0 | | |
| 6 d | 8 | 20,5 ± 3,5 | | |
| 7 d | 9 | 21,0 ± 0,95 | | |
| 8 d | 7 | 23,4 ± 0,65 | | |
| 9 d | 7 | 24,0 ± 1,2 | | |

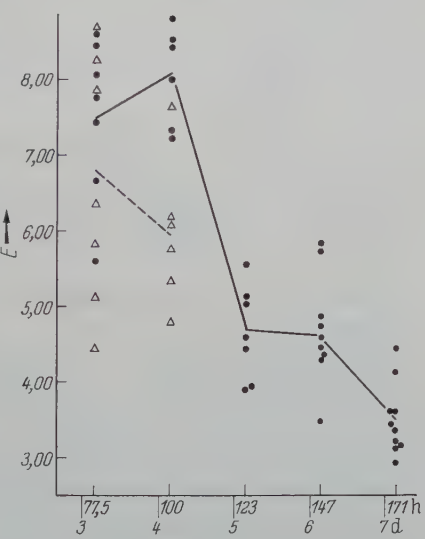



Abb. 2b. Konzentration der gesamten Ninhydrin-positiven Substanzen in 13,8 mm³ *Hämolymphe*. Symbole wie in Abb. 2a. Weitere Erläuterungen auf S. 305

Fällung der Eiweiße kurz mit kochendem Wasser behandelt hatte. Die Meßkurven für eine konstante Menge *Hämolymphe* weisen aber ebenfalls bedeutende Unterschiede auf. Die Konzentration der Ninhydrin-positiven Stoffe bleibt bei *ltr/ltr*-Larven praktisch in allen untersuchten Entwicklungsstadien gleich hoch und liegt auf einem wesentlich höheren Niveau als bei heterozygoten Kontrollen.

Die entsprechenden Unterschiede zwischen *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Larven sind viel geringer. Die Meßkurve für *lgl/lgl*-Tiere sinkt gemäß der Entwicklungsverzögerung bei den Letalen lediglich langsamer ab als die der Kontrollen. *ltr/ltr*-Larven enthalten im gesamten untersuchten Entwicklungsbereich 3mal mehr Hämolymphe als Kontrollen, und ihre Körperflüssigkeit ist doppelt so konzentriert an freien Aminosäuren und Peptiden als die der *ltr/+*-Tiere. *lgl/lgl*-Larven akkumulieren erst vom 5. Lebenstage an 3mal mehr Hämolymphe als die Kontrollen (Tabelle 2), und ihre Körperflüssigkeit ist bis zum Alter von 4—5 Tagen nur wenig konzentrierter an freien Aminosäuren und Peptiden als die der Kontrollen. Bei verpuppungsreifen *lgl/lgl*-Larven ist der Gehalt der Ninhydrin-positiven Substanzen im Blut im Vergleich zu den entwicklungsphysiologisch gleich alten Kontrollen stark herabgesetzt.

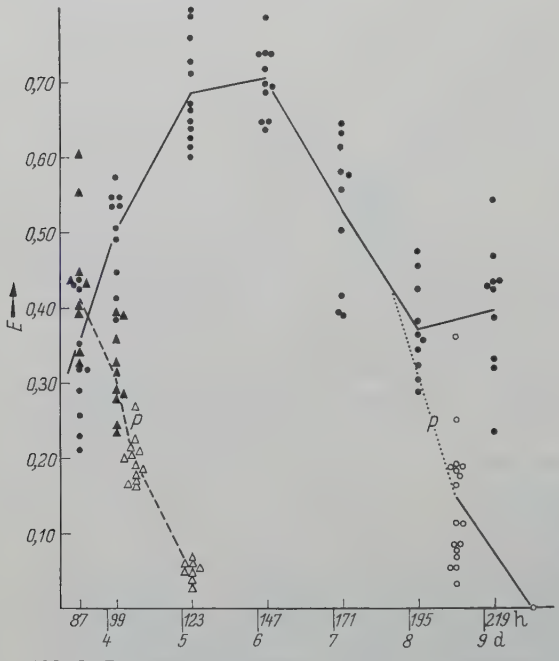



Abb. 3. Die Menge der *Peptide 1 und 2* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

### *4. Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren und Peptide im Körperextrakt*

**a) Mengenveränderungen während der Entwicklung vom mittleren 3. Larvenstadium bis zur Puparisierung.** Um tiefere Einblicke in den Ablauf des Aminosäurestoffwechsels zu erhalten, ist es nötig, das Verhalten der auf zweidimensionalen Chromatogrammen einzeln nachweisbaren freien Eiweißbausteine im Verlaufe der Entwicklung zu beschreiben.

*Peptid 1 und 2* (Abb. 3). Die Meßkurve der Extinktionswerte für Heterozygote fällt steil ab, junge Puppen im Alter von 5 Tagen enthalten nur noch Spuren der beiden Verbindungen. *lgl/lgl*-Larven zeigen bis zum Alter von 6 Tagen eine Vermehrung der beiden Substanzen um mehr als das Doppelte der Werte 87stündiger letaler Tiere. Bei noch älteren, letalen Tieren nimmt die Peptidmenge wieder ab, bis sie bei 8—9 Tage alten *lgl/lgl*-Larven Werte aufweist, die denen verpuppungsreifer Kontrollen vergleichbar sind. Während der Puppariumbildung sinkt der Gehalt der beiden Peptide erneut stark, und bei älteren Pseudopuppen sind beide Substanzen fast nie mehr nachweisbar. Die beiden Peptide wurden von BENZ (1955) bei normalen *Drosophila*-Larven näher analysiert und unter dem Namen *Larvin I und II* nach HADORN und MITCHELL (1951) beschrieben. Das quantitative Verhalten dieser Substanzen stimmt während der Entwicklung bei normalen Larven und *lgl/Cy*-Tieren überein.

Ein weiteres von Benz beschriebenes Peptid, *Präpupin*, mit den $R_f$-Werten 0,055 in Propanol-Wasser und 0,175 in wassergesättigtem Phenol, konnte auch bei *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Larven nachgewiesen werden, wurde aber, der meist unscharfen Trennung wegen, gemeinsam mit den *Peptiden 1 und 2* bestimmt.

*Peptid 3* (Abb. 4). Die Meßkurve der Kontrollen zeigt bei großer Streuung der Einzelwerte geringe Differenzen zwischen verpuppungsreifen Larven und Puppenstadien. Im Gegensatz dazu steigen die Extinktionswerte für *Peptid 3* bei Letalen um mehr als das Dreifache innerhalb einer Zeitspanne von 2 Tagen und erreichen ihr Maximum bei 5—6 Tage alten Tieren. Daraufhin sinken sie um fast den gleichen Betrag ab und erreichen ähnliche Werte wie bei verpuppungsreifen Kontrollen. Die Streuung ist bei den Extinktionswerten des *Peptids 3* besonders hoch, weil die Farbreaktion dieser Substanz mit Ninhydrin wenig empfindlich ist (Stumm-Zollinger 1954). *Peptid 3* färbt sich mit Ninhydrin gelborange. Die gemessenen Extinktionswerte sind sehr niedrig und werden wahrscheinlich im Bereich von 0,00—0,020 Extinktionseinheiten nicht mehr mit genügender Genauigkeit vom Spektrophotometer erfaßt. Das Peptid 3 wurde von Benz (1955) unter dem Namen Metamorphin beschrieben.

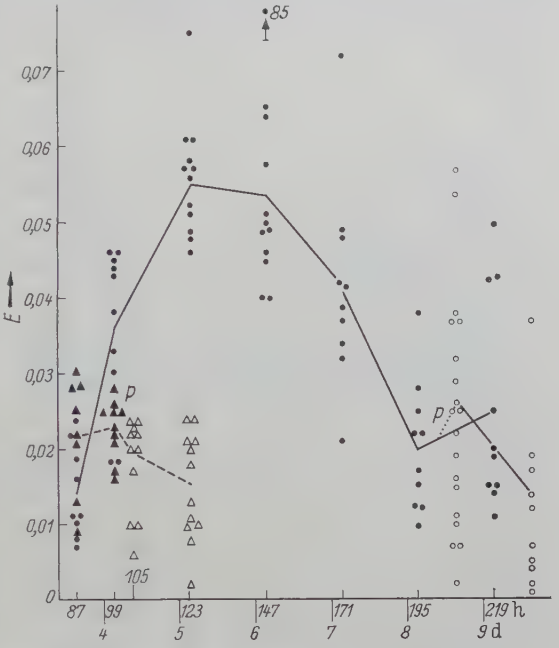



Abb. 4. Die Menge des *Peptids 3* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

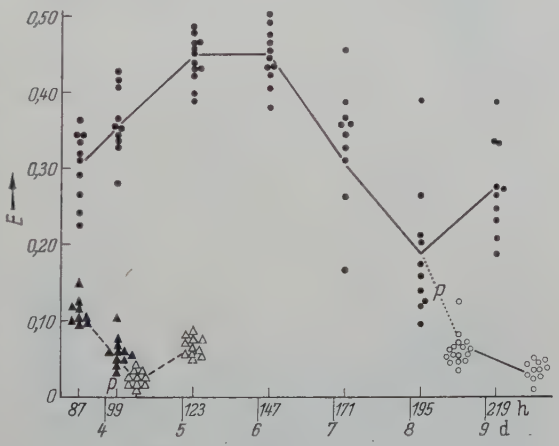



Abb. 5. Die Menge des *Peptids 4* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

Sein quantitatives Verhalten während der Entwicklung stimmt im allgemeinen bei Drosophila-Larven des Wildgenotyps und bei *lgl/Cy*-Tieren überein.

*Peptid 4* (Abb. 5). *Peptid 4* ist bei letalen Larven in allen untersuchten Entwicklungsstadien in größerer Menge vorhanden als bei Heterozygoten. Der Gehalt an dieser Substanz ist bei 87 Std alten *lgl/lgl*-Homozygoten etwa 3mal höher

als bei gleich alten vitalen Zuchtgeschwistern. 99 Std alte *lgl/lgl*-Larven haben 7mal mehr *Peptid 4* als gleich alte *lgl/Cy*-Tiere, und die Kurve der Letalen erreicht ein Maximum bei 5—6 Tage alten Individuen. Die Meßwerte sinken im Laufe der beiden folgenden Tage bei *lgl/lgl*-Tieren stark ab. Junge Pseudopuppen mit ungefärbter Hülle enthalten etwa gleiche Mengen an *Peptid 4* wie entwicklungsphysiologisch gleichalte heterozygote Vorpuppen. Bei älteren Pseudopuppen nimmt der Gehalt an Peptid 4 weiterhin ab, bei heterozygoten Puppen dagegen wieder zu. BENZ nennt das *Peptid 4* *Drosophilin*. Es verhält sich mengenmäßig bei +/+- und *lgl/Cy*-Tieren analog.

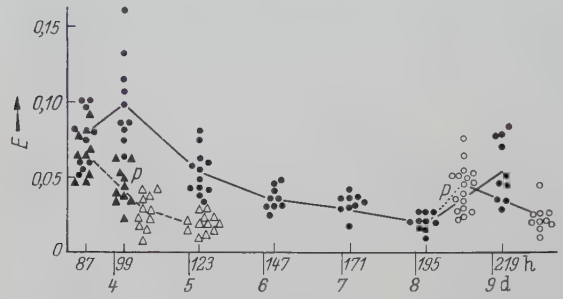



Abb. 6. Die Menge der *Asparaginsäure* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

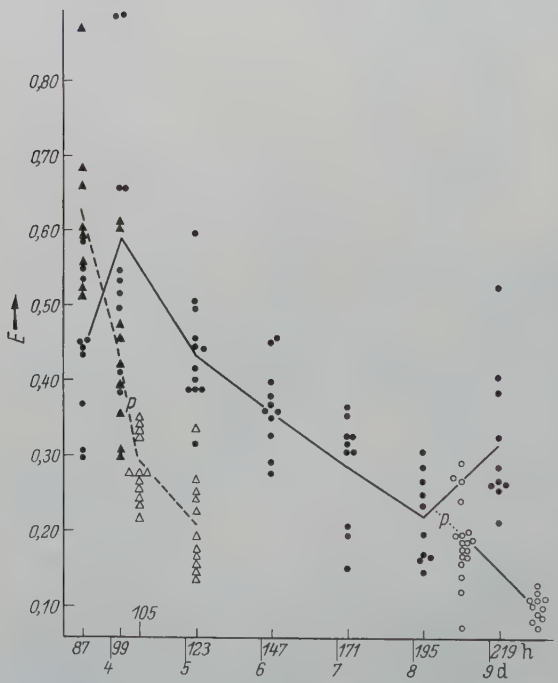



Abb. 7. Die Menge der *Glutaminsäure* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Asparaginsäure* (Abb. 6). Diese Aminosäure ist zwar in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachweisbar, zeigt jedoch sehr niedrige Extinktionswerte. Die Meßkurve für Heterozygote sinkt im untersuchten Zeitabschnitt stetig ab, während die Meßwerte für *lgl/lgl*-Tiere zunächst ansteigen und bei 99 Std alten Larven einen Kurvengipfel bilden. In den folgenden Tagen sinkt die Kurve für die *lgl/lgl*-Larven ebenfalls, und die Meßwerte von überalterten, letalen Larven und von Pseudopuppen liegen auf annähernd gleichem Niveau, wie bei verpuppungsreifen *lgl/Cy*-Larven und -Puppen.

*Glutaminsäure* (Abb. 7). Die Meßkurve der *lgl/Cy*-Tiere fällt von Höchstwerten bei 87stündigen Larven steil ab und erreicht bei den Puppenstadien Extinktionswerte, die 3—2mal tiefer liegen als diejenigen des Kurvenmaximums. 87 Std alte *lgl/lgl*-Larven weisen gesichert weniger *Glutaminsäure* auf als ihre gleichalten heterozygoten Zuchtgeschwister. Im Alter von $3^1/_2$—4 Tagen steigt der Gehalt an dieser Aminosäure bei letalen Tieren und erreicht ein Maximum bei 99stündigen Larven, das annähernd auf dem gleichen Niveau liegt wie dasjenige 87stündiger

*lgl*/*Cy*-Larven. Daraufhin nehmen die Meßwerte für *lgl*/*lgl*-Larven mitzunehmendem Alter der Versuchsobjekte laufend ab und erreichen ein Minimum bei 8 Tage alten als Larven überlebenden Tieren. Während der Puppariumbildung der Letalen sinkt die Menge der *Glutaminsäure* weiterhin stark ab, so daß ältere Pseudopuppen nur noch etwa den 6. Teil des anfänglichen Maximalgehaltes dieser Substanz aufweisen.

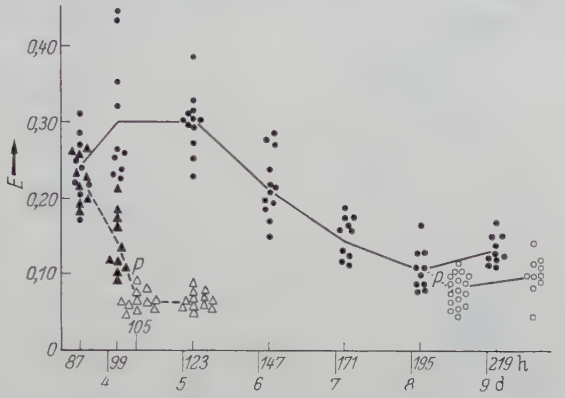



Abb. 8. Die Menge des *Serins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Serin* (Abb. 8). Larven im Alter von 87 Std weisen bei beiden Genotypen annähernd gleich große Mengen an *Serin* auf. Bei Heterozygoten sinkt die Meßkurve für diese Substanz im Laufe der weiteren Entwicklung steil ab und verharrt bei Vorpuppen und jungen Puppen auf dem gleichen niedrigen Niveau, dessen Werte etwa den 3. Teil der Maximalwerte 87stündiger Larven ausmachen. Bei *lgl*/*lgl*-Tieren steigt die Kurve zunächst an und erreicht bei 4—5tägigen Objekten einen Gipfel. Ihr weiterer Verlauf ist gekennzeichnet durch ein stetiges Abfallen bis zu einem Minimum für 8 Tage alte Tiere, das in seinen Werten demjenigen 99 Std alter verpuppungsreifer Heterozygoten entspricht. Die untersuchten Pseudopuppenstadien enthalten etwas mehr *Serin* als entwicklungsphysiologisch gleich alte Puppenstadien der Kontrollen.

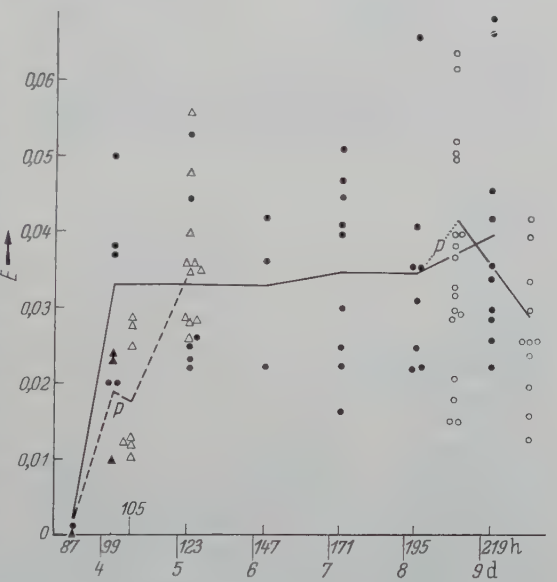



Abb. 9. Die Menge des *Taurins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Taurin* (Abb. 9). Der Verlauf der *Taurin*-Kurve zeigt, daß diese Aminosäure völlig anderen physiologischen Gesetzmäßigkeiten unterliegt als die bisher besprochenen Ninhydrin-positiven Substanzen. 87 Std alte Larven beider Genotypen enthalten kaum meßbare Spuren *Taurin*. Beim Herannahen der Verpuppungsreife steigt die Kurve für die Heterozygoten sprunghaft an und erreicht die höchsten Meßwerte innerhalb des untersuchten Entwicklungsbereiches bei jungen Puppen. Die Kurve der Letalen steigt bei $3^1/_2$—4 Tage alten Tieren eben-

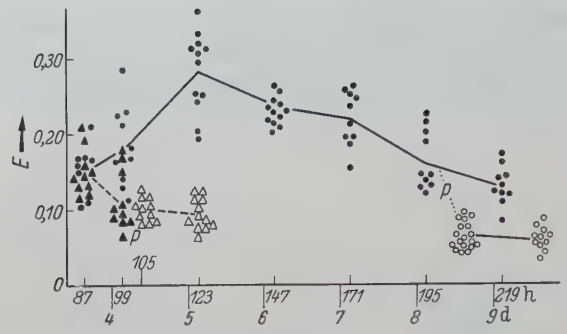



Abb. 10. Die Menge des *Glycins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

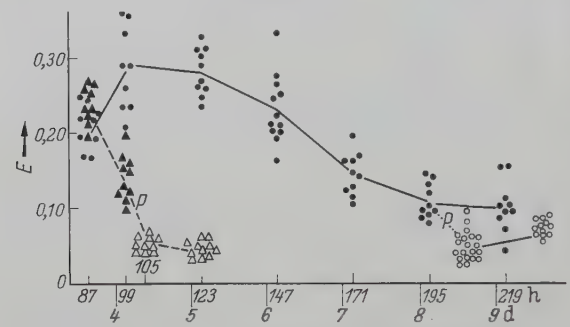



Abb. 11. Die Menge des *Threonins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

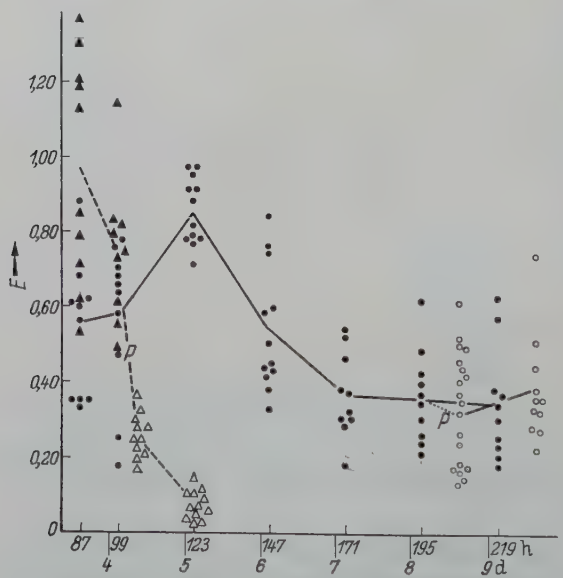



Abb. 12. Die Menge des α-*Alanins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

falls und erreicht für 99 Std alte Larven Werte, die annähernd gleich hoch sind wie diejenigen junger Puppen des *lgl*/*Cy*-Genotyps. Die Meßwerte für überalterte *lgl*/*lgl*-Larven verharren auf diesem Niveau und nehmen bei Letalen, die die Altersgrenze von 7 Tagen überschreiten, leicht zu. Bei älteren Pseudopuppen nimmt die *Taurin*-Menge dagegen ab. Für die große Streuung der Meßwerte sind die niedrigen Extinktionswerte (vgl. S. 309) und die Beschaffenheit des Futters verantwortlich. Hungernde Tiere enthalten wesentlich größere Mengen *Taurin* als Larven denen genügend frisches Futter zur Verfügung steht.

*Glycin* (Abb. 10). Beide Genotypen führen im Alter von 87 Std annähernd gleich große Mengen *Glycin*. Für Heterozygote liegt in diesem Zeitpunkt das Mengenmaximum im Bereich des untersuchten Entwicklungsabschnittes, für Letale das Anfangsminimum. Die Kurve für normale Larven sinkt während der Verpuppungsreife der Tiere merklich, nach Ausbildung der Puppenhülle kaum ab. Die Werte für *lgl*/*lgl*-Tiere nehmen dagegen zu und erreichen bei 5 Tage alten Larven ein Maximum. Bei mehr als 5 Tage alten letalen Larven sinkt der Gehalt des *Glycins* ab und erreicht für 8 Tage alte Tiere das Niveau 87stündiger *lgl*/*lgl*-Larven. Der Gehalt an *Glycin* bei Pseudopuppenstadien liegt etwa auf demselben Niveau wie bei entwicklungsphysiologisch gleichalten heterozygoten Puppenstadien.

*Threonin* (Abb. 11). Die graphische Darstellung für die vitalen Tiere ist durch starkes Absinken der Meßwerte vom mittleren 3. Larvenstadium bis zur Puppenhüllenbildung ausgezeichnet, und junge Puppen und Vorpuppen unterscheiden sich kaum in ihrem Gehalt an *Threonin*. Die Kurve für Letale steigt zunächst an und erreicht ihr Maximum bei 99 Std alten Tieren. Der Gehalt an *Threonin* nimmt bei älteren Letalen wieder ab und ist bei 8 Tage alten *lgl/lgl*-Larven annähernd ebenso groß wie bei verpuppungsreifen heterozygoten Tieren. Pseudopuppen enthalten weniger *Threonin* als ihre im Larvenstadium verharrenden letalen Geschwister. Die Extinktionswerte für die untersuchten Puppenstadien liegen bei *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Tieren auf annähernd gleich hohem Niveau. Bei älteren Pseudopuppen macht sich jedoch eine leichte Anstiegstendenz der Meßwerte bemerkbar.

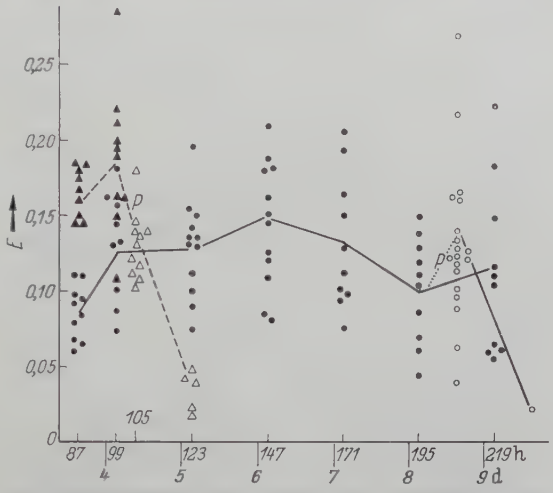



Abb. 13. Die Menge des *Tyrosins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*α-Alanin* (Abb. 12). *α-Alanin* ist bei heterozygoten Larven im 3. Larvenstadium in wesentlich größerer Menge vorhanden als bei Letalen. Die Meßkurve für Heterozygote fällt innerhalb des untersuchten Entwicklungsbereiches steil ab. 87 Std alte *lgl/Cy*-Larven enthalten etwa 10mal mehr *α-Alanin* als 5 Tage alte Puppen des gleichen Genotyps. Die Kurve für die Letalen steigt zunächst im Larvenalter von 87—123 Std an und erreicht bei 5 Tage alten Tieren einen Gipfel, der etwas tiefer liegt als das Niveau der Werte 87stündiger heterozygoter Larven. Im Verlaufe zweier weiterer Tage sinkt die Menge des *α-Alanins* bei den Letalen um etwa die Hälfte des Maximalbetrages und bleibt dann nahezu konstant. Pseudopuppen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an *α-Alanin* nicht von gleich alten als Larven überlebenden *lgl/lgl*-Tieren, sie enthalten jedoch größere Mengen dieser Aminosäure als junge 5tägige, heterozygote Puppen.

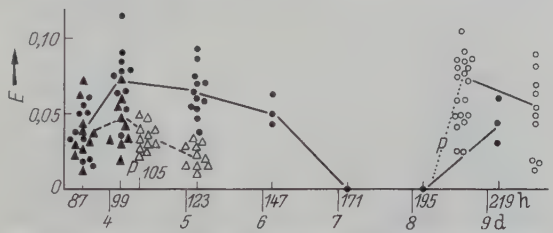



Abb. 14. Die Menge des *β-Alanins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Tyrosin* (Abb. 13). Die Meßkurven beider Genotypen sind charakterisiert durch eine starke Abnahme des *Tyrosin*-Gehaltes bei Tieren mit ausgefärbten Puparien gegenüber jüngeren Entwicklungsstadien, denn bei der Pigmentbildung wird das *Tyrosin* zum Aufbau des Melanins verwendet, wie Raper (1926, 1927) nachweisen konnte. Als Larven überlebende *lgl/lgl*-Tiere zeigen einen ziemlich

konstant bleibenden *Tyrosin*-Gehalt, der während des gesamten untersuchten Entwicklungszeitraumes auf einem etwas niedrigeren Niveau liegt als für *lgl/Cy*-Tiere. Die starke Streuung der Extinktionswerte, besonders bei überalterten, letalen Larven und bei Pseudopuppen mit farblosem Puparium, beruht vielleicht auf einer mit dem Alter zunehmenden stoffwechselphysiologischen Uneinheitlichkeit der letalen Tiere.

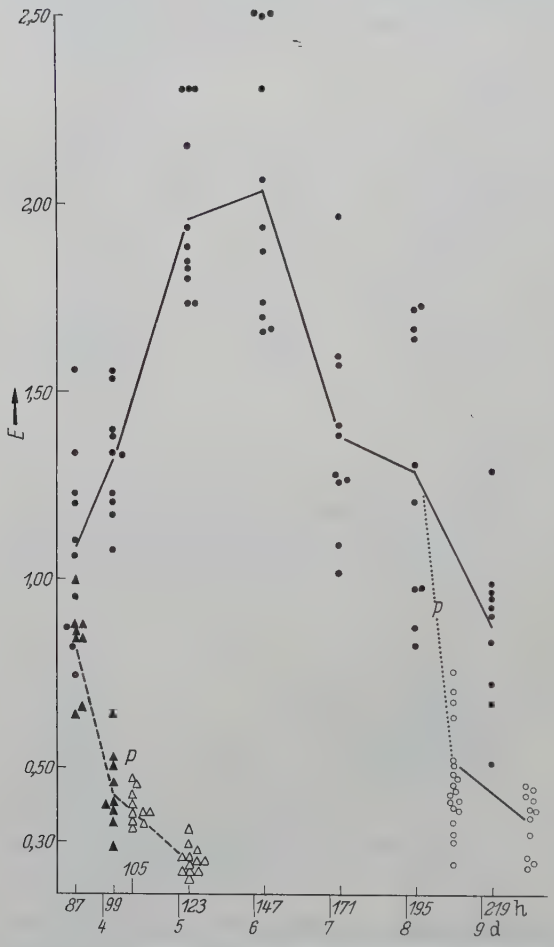



Abb. 15. Die Menge des *Glutamins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*β-Alanin* (Abb. 14). *β-Alanin* weist bei Verarbeitung von 10 Larven oder 20 Puppen für ein zweidimensionales Chromatogramm sehr niedrige Extinktionswerte auf. Die Meßkurve für *lgl/Cy*-Tiere zeigt ein wenig ausgeprägtes Maximum bei 99 Std alten Tieren. Die Kurve für *lgl/lgl*-Tiere zeichnet sich durch 2 Gipfel aus. Der erste liegt bei Larven im Alter von 99 Std und der zweite bei jungen Pseudopuppen und bei Tieren, die das Alter von 9 Tagen als Larven überschreiten. Beide Kurvengipfel der *lgl/lgl*-Tiere liegen höher als das Maximum der Meßkurve für Heterozygote. Bei *lgl/lgl*-Larven im Alter von 7—8 Tagen geht die Meßkurve durch ein Minimum, das hart an der Nullgrenze liegt. Pseudopuppen weisen durchwegs einen größeren Gehalt an *β-Alanin* auf als entwicklungsphysiologisch gleich alte normale Puppen.

*Glutamin* (Abb. 15). In allen untersuchten Entwicklungsstadien enthalten die letalen Individuen größere Mengen *Glutamin* als die heterozygoten Tiere. Vom Anfangsmaximum für 87 Std alte normale Larven fällt der Gehalt dieses Amids bei 5tägigen Puppen bis auf den 4. Teil des Höchstwertes ab. Die *Glutamin*-Menge der *lgl/lgl*-Larven steigt von einem Anfangsminimum 99stündiger Tiere innerhalb von $2^1/_2$ Tagen auf das Doppelte an und zeigt bei 6 Tage alten Tieren ein Maximum. Im Verlauf der folgenden 3 Tage sinkt sie ebenso rasch wieder ab bis auf Werte, die unter dem Niveau des anfänglichen Minimums liegen. Bei jungen Pseudopuppen nimmt die Menge an *Glutamin* abermals stark ab, so daß der Unter-

schied im Gehalt dieses Amids für Puppenstadien beider Genotypen nur noch gering ist.

*Ornithin-Lysin* und *Arginin* (Abb. 16 und 17). Diese basischen Aminosäuren sind mit unseren Methoden schlecht trennbar (STUMM-ZOLLINGER 1954), deshalb sind die Maxima für ältere *lgl/lgl*-Larven nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den anderen Aminosäuren und Peptiden, und die Streuung der Meßwerte ist relativ hoch. Immerhin ist aus Abb. 16 und 17 ersichtlich, daß auch bei diesen Aminosäuren die Extinktionswerte für heterozygote Larven, die verpuppungsbereit sind, stark absinken. Das Anfangsmaximum für *lgl/Cy*-Tiere ist bei *Ornithin-Lysin* etwa 5mal, bei *Arginin* etwa 4mal höher als das Minimum junger Puppen des gleichen Genotyps. Die Menge der 3 Aminosäuren nimmt bei Letalen zunächst langsam zu und verharrt bei Tieren bis zum 6. Lebenstage auf einem annähernd gleich hohen Niveau. Im Verlaufe der folgenden Lebenstage sinkt der Gehalt der 3 Substanzen bei *lgl/lgl*-Larven ab und erreicht bei Pseudopuppen Extinktionswerte, die etwa denjenigen heterozygoter Puppen entsprechen.

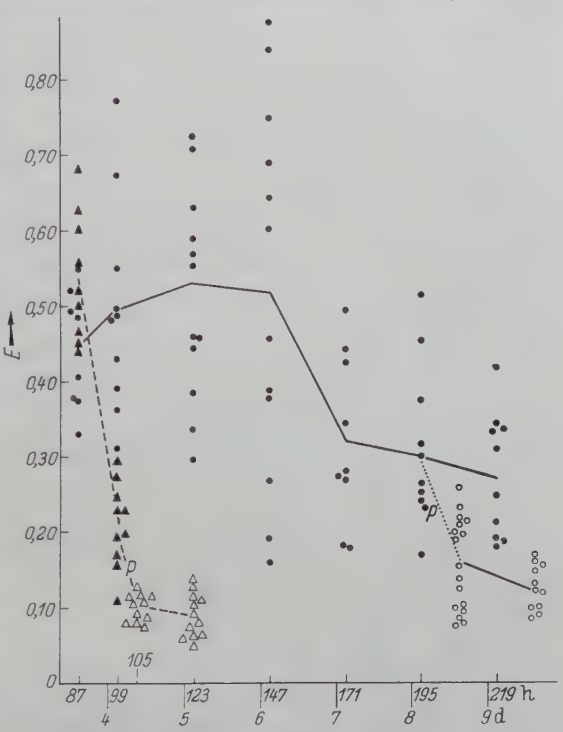



Abb. 16. Die Menge von *Ornithin-Lysin* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

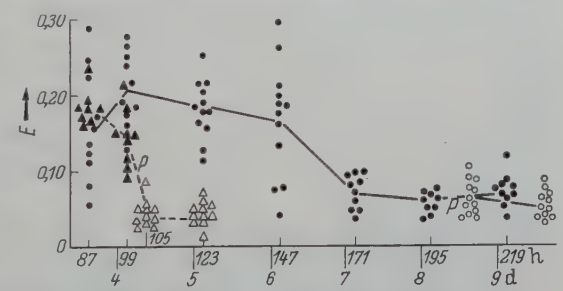



Abb. 17. Die Menge des *Arginins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Histidin* (Abb. 18). Von annähernd gleichen Werten für 87 Std alte Larven beider Genotypen ausgehend, sinkt die Meßkurve für alle Heterozygoten bis zum Beginn des Puppenstadiums auf Werte, die durchschnittlich den 3. Teil der Höhe des Anfangsmaximums ausmachen. Normale Vorpuppen und junge Puppen enthalten gleich viel *Histidin*. Die Kurve der Letalen zeigt zunächst ansteigende Werte und erreicht ein Mengenmaximum bei 5 Tage alten Tieren. Im Verlaufe der 3 folgenden Tage sinken die Extinktionswerte und streben dem Niveau zu, das 99 Std alten heterozygoten Larven entspricht. Junge Pseudopuppen unterscheiden

sich nicht in ihrem *Histidin*-Gehalt von gleichaltrigen letalen Larvengeschwistern. Bei älteren Pseudopuppen nehmen die Extinktionswerte dagegen ab und erreichen das Niveau, welches jungen heterozygoten Puppen entspricht.

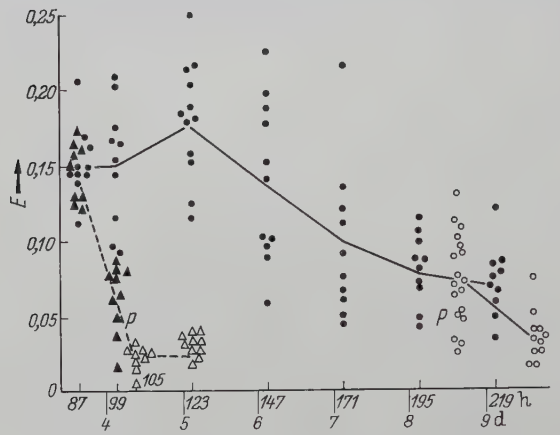



Abb. 18. Die Menge des *Histidins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

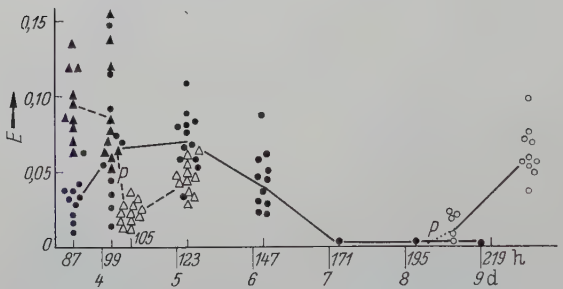



Abb. 19. Die Menge des *Valins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

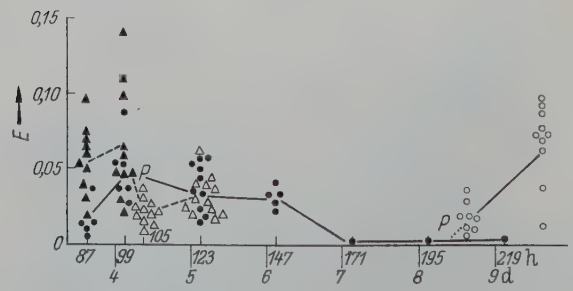



Abb. 20. Die Menge des *Leucins* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

*Prolin.* Die Farbreaktion des *Prolins* mit Ninhydrin (hellgelbe Farbe) ist wenig empfindlich (STUMM-ZOLLINGER 1954), und die Extinktionswerte, die sich nach der quantitativen Auswertung ergeben, sind dementsprechend niedrig und streuen sehr stark. Nach statistischen Berechnungen enthalten 4—7 Tage alte *lgl/lgl*-Tiere gesichert mehr *Prolin* als die untersuchten Larven- und Puppenstadien der Kontrollen. *lgl/lgl*-Larven, die das Alter von 7 Tagen überschreiten und Pseudopuppen, unterscheiden sich in ihrem Prolinsgehalt nicht von verpuppungsreifen Kontrolltieren und jungen heterozygoten Vorpuppen und Puppen.

*Valin* und *Leucin* (Abb. 19 und 20). Die beiden Aminosäuren verhalten sich während der Entwicklung quantitativ analog. Von Höchstwerten bei 87—99 Std alten Larven ausgehend, sinken die Meßkurven der Kontrolltiere bei Vorpuppen mit farbloser Chitinhülle auf ein Minimum ab und steigen dann bis zur Altersstufe 5tägiger heterozygoter Puppen leicht an, ohne die anfänglichen Maximalwerte zu erreichen. Die Kurven von *Valin* und *Leucin* bei *lgl/lgl*-Tieren steigen im Alter von 87—99 Std zunächst an und erreichen bei 4—5tägigen Larven ein Maximum. Daraufhin nehmen die Extinktionswerte ab, und die Kurven gehen bei 7—9tägigen letalen Larven durch ein Minimum, das hart an der Nullgrenze liegt. Junge, farblose Pseudopuppen weisen eine merklich größere Menge an *Valin* und *Leucin* auf als letale Tiere, die im Larven-

stadium verharren, und bei älteren Pseudopuppen bilden die Meßkurven erneut einen Gipfel, dessen Niveau etwa dem Maximum bei 4—5tägigen letalen Larven entspricht.

*Tryptophan* und *Kynurenin* (Tabelle 3). Larven und junge Vorpuppen mit noch ungefärbter Chitinhülle enthalten nur Spuren dieser Verbindungen. Dagegen treten beide bei heterozygoten Puppen mit ausgefärbter Hülle im Alter von 5 Tagen in meßbarer Menge auf. Entwicklungsphysiologisch gleich alte Pseudopuppen enthalten immer *Tryptophan* und zwar in wesentlich größeren Mengen als die Heterozygoten, während *Kynurenin* bei ihnen weiterhin nur in Spuren nachweisbar ist. *Kynurenin* wandert zwar in Phenol etwas schneller und in Propanol etwas langsamer als *Tryptophan*, konnte aber oft nicht scharf von *Tryptophan* getrennt werden. Für die quantitativen Bestimmungen wurden deshalb beide Substanzen gemeinsam verwertet. *lgl/Cy*-Puppen, die heterozygot für *cn* und *bw* sind, enthalten in geringen Mengen *Tryptophan* und *Kynurenin*. *lgl/lgl*-Tiere sind homozygot für *cn* und *bw* und müßten deshalb nach Danneel und Zimmermann (1954) *Kynurenin* akkumulieren, da sie diese Verbindung nicht zum Aufbau des braunen Augenpigments weiterverarbeiten können. Es scheint bei ihnen jedoch schon die Synthese des *Kynurenins* aus dem *Tryptophan* weitgehend gestört zu sein, da sie *Kynurenin* nur in Spuren enthalten und stattdessen *Tryptophan* akkumulieren. Die Anreicherung von *Tryptophan* könnte aber auch im Sinne einer stoffwechselphysiologischen Anomalie bei den absterbenden Pseudopuppen gedeutet werden.

Tabelle 3. *Tryptophan- und Kynureningehalt bei lgl/Cy-Puppen und lgl/lgl-Pseudopuppen (je 20 Individuen)*
Angegeben sind die Mittelwerte der Extinktion und ihre mittleren Fehler. Alle Zahlenwerte wurden mit $10^3$ multipliziert

| Genotyp | Entwicklungsstadium | n | Extinktion |
|---|---|---|---|
| *lgl/Cy* | Vorpuppen Hülle ungefärbt | 11 | — |
| | Puppen Hülle gefärbt | 10 | 33,5 ± 4,0 |
| *lgl/lgl* | Pseudopuppen Hülle ungefärbt | 4 | 72,0 ± 19,1 |
| | Pseudopuppen Hülle gefärbt | 11 | 110,0 ± 9,8 |

Tabelle 4. *Gehalt an Dopa bei farblosen Vorpuppen und Pseudopuppen (je 20 Individuen)*
Angegeben sind die Mittelwerte der Extinktion und ihre mittleren Fehler. Alle Zahlenwerte wurden mit $10^3$ multipliziert

| Genotyp | n | Extinktion |
|---|---|---|
| *lgl/Cy* | 7 | 41,0 ± 7,1 |
| *lgl/lgl* | 9 | 61,0 ± 10,0 |

*γ-Aminobuttersäure* (Abb. 21). Diese Verbindung tritt in meßbaren Mengen bei 87—99 Std alten Larven auf. Ihr Gehalt ist bei Kontrollen etwas höher als bei Letalen. In den untersuchten Puppenstadien der heterozygoten Tiere ist die Substanz nicht mehr nachweisbar, und auch als Larven überlebende *lgl/lgl*-Tiere und Pseudopuppen enthalten nur Spuren von *γ-Aminobuttersäure*.

*Dopa* (Tabelle 4). Diese sich mit Ninhydrin gelb färbende Substanz tritt in meßbaren Mengen nur bei Puppenstadien mit farbloser Chitinhülle auf. Sie ist bei *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Individuen nachweisbar. Die Befunde (Tabelle 4) deuten darauf hin, daß *Dopa* bei den letalen Tieren in etwas größeren Mengen vorkommt als bei den Kontrollen. Der Unterschied der Mittelwerte konnte jedoch nicht statistisch gesichert werden.

„*Marine-blau*". Man findet den Fleck „*Marine-blau*" nur auf Chromatogrammen älterer Pseudopuppen. Wahrscheinlich handelt es sich bei der vorliegenden Substanz um ein Abbauprodukt der in der Puppenhülle absterbenden und degenerierenden *lgl/lgl*-Tiere.

Das quantitative Verhalten der einzelnen freien Aminosäuren und Peptide im untersuchten Entwicklungsbereich stimmt bei *lgl/Cy*-Tieren im allgemeinen mit den Befunden an normalen *Drosophila*-Larven (BENZ 1955) überein. Leichte Diskrepanzen bestehen nur bei Substanzen, die relativ niedrige Extinktionswerte aufweisen, wie *Asparaginsäure, Valin* und *Leucin. Tryptophan, Kynurenin* und *Dopa* wurden von BENZ nicht untersucht.

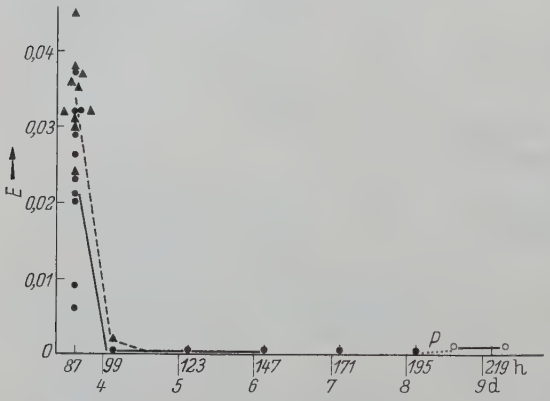



Abb. 21. Die Menge der *γ-Aminobuttersäure* im *Körperextrakt* einer konstanten Anzahl von Tieren. Zeichen wie in Abb. 1

**b) Zusammenfassung und Deutung.** Beim Vergleich der Extinktionskurven der einzelnen freien Aminosäuren und Peptide (Abb. 3—21, Tabelle 3 und 4) mit der entsprechenden graphischen Darstellung der gesamten Ninhydrin-positiven Substanzen im Körperextrakt von *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tieren (Abb. 1) lassen sich die einzelnen Eiweißbausteine nach dem Verlauf ihrer Meßkurven innerhalb des untersuchten Entwicklungsbereiches in 2 Gruppen einteilen: Eine I. Gruppe weist das gleiche Kurvenbild auf wie die Gesamtmenge aller Ninhydrin-positiven Substanzen. Die graphische Darstellung ist bei Heterozygoten durch einen mehr oder weniger steil abfallenden, *umgekehrt S-förmigen* Verlauf gekennzeichnet.

Bei *lgl/lgl*-Tieren ist die Form der Kurve ebenfalls umgekehrt S-förmig, aber infolge der Anreicherung von Ninhydrin-positiven Substanzen und der Entwicklungsverzögerung der Larven sowohl *in der Horizontalen* als auch in der *Vertikalen gestreckt*. Besonders charakteristisch für die Kurve der *lgl/lgl*-Tiree ist der hohe Gipfel bei letalen Larven im Alter von 4—6 Tagen. Die freien Aminosäuren und Peptide der II. Gruppe haben eine andere Kurvenform und tragen somit nicht zur Kurvencharakteristik der Gesamtmenge aller Ninhydrin-positiven Substanzen bei.

Zur Gruppe II gehören folgende Substanzen: *Taurin, Tyrosin, Dopa, β-Alanin, Valin, Leucin, Tryptophan* und *Kynurenin, γ-Aminobuttersäure* und „*Marine-blau*". Diese Verbindungen weisen im Vergleich zu den Substanzen der Gruppe I relativ niedrige Extinktionswerte auf. *Taurin*, ein Abbauprodukt des Cysteins (LEHNARTZ 1952), tritt in zunehmender Menge beim Herannahen der Verpuppungsreife auf und ist in der größten Konzentration in Puppenstadien bei *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tieren vorhanden. *Tyrosin* und *Dopa* beteiligen sich am Aufbau des Melanins und treten deshalb kurz vor der Ausfärbung der frisch gebildeten Puparien in der größten Menge auf. *β-Alanin* verhält sich bei Letalen ähnlich wie *Valin* und *Leucin*. Die Meßkurven der 3 Aminosäuren weisen ein Maximum bei 4 bis

5 Tage alten *lgl/lgl*-Larven auf und gehen bei 7—8 Tage alten letalen Tieren durch ein Minimum, das hart an der Nullgrenze liegt. Pseudopuppenstadien enthalten alle 3 Verbindungen wieder in meßbaren Mengen. *Tryptophan* und *Kynurenin* funktionieren als Bausteine der Augenpigmente, die während der Metamorphose gebildet werden und treten erst bei Puppenstadien in meßbaren Mengen in Erscheinung. *γ-Aminobuttersäure* ist ein Decarboxylierungsprodukt der *Glutaminsäure* und wurde in Hefeextrakten gefunden. Migrierende *Drosophila*-Larven nehmen nur noch wenig Nahrung zu sich, vielleicht nimmt deshalb die Menge der *γ-Aminobuttersäure* mit dem Herannahen der Verpuppungsreife ab. Über „*Marineblau*" wurden bereits auf S. 302 und 318 Angaben gemacht.

Zur Gruppe I gehören folgende Verbindungen: Die *Peptide 1, 2, 3 und 4*, *Asparaginsäure*, *Glutaminsäure*, *Serin*, *Glycin*, *Threonin*, *α-Alanin*, *Lysin*, *Arginin*, *Glutamin*, *Prolin* und *Histidin*. Der vorübergehende Anstieg der Meßkurven dieser Substanzen bei 4—6 Tage alten *lgl/lgl*-Larven könnte auf einem gehemmten Eiweißaufbau beruhen. Er hält vielleicht nicht Schritt mit der intensiven Nahrungsaufnahme bei den letalen Tieren im mittleren 3. Larvenstadium. Besonders ausgeprägt ist die Mengenzunahme beim *Glutamin* (Abb. 15) und den *Peptiden 1, 2 und 4* (Abb. 3 und 5). *Glutamin* könnte als Speichersubstanz und Entgifter wirken (Stumm-Zollinger 1954, Baldwin 1957), falls im Körper der *lgl/lgl*-Larven Ammoniak oder Aminogruppen im Überschuß vorhanden sind. Die Anreicherung der *Peptide* weist eventuell auf eine Reduktion der Fähigkeit hin, Eiweiße aus Polypeptiden zu synthetisieren. Bei *lgl/lgl*-Larven, die das Alter von 6 Tagen überschreiten, sinkt die Menge der in Gruppe I angeführten Ninhydrin-positiven Substanzen im Körperextrakt und erreicht für 7—9 Tage alte letale Larven bei jeder einzelnen Verbindung annähernd das Niveau, das verpuppungsreifen heterozygoten Kontrollen entspricht. Vielleicht sind ältere letale Larven vor der Puppariumbildung genötigt, ihre gespeicherten Ninhydrin-positiven Substanzen direkt zur Energielieferung anzugreifen, falls entweder die Eiweißverdauung gestört ist, oder die migrierenden Larven nicht mehr soviel fressen, daß der Betriebsstoffwechsel durch die aufgenommene und normal verdaute Nahrung bestritten werden könnte. *Glutaminsäure* und *α-Alanin* findet man bei $3^1/_2$ Tage alten *lgl/Cy*-Larven in gesichert größerer Menge als bei absolut gleich alten letalen Larven. Diese beiden Aminosäuren sind für den intermediären Stoffumsatz von größter Bedeutung. Sie beteiligen sich an Transaminierungsvorgängen und treten somit in nahe Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel. Der höhere Gehalt der beiden Verbindungen bei heterozygoten Kontrollen könnte möglicherweise auf einen intensiveren Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel bei *lgl/Cy*-Tieren des mittleren 3. Larvenstadiums gegenüber absolut gleich alten *lgl/lgl*-Larven hindeuten.

### *5. Konzentration der einzelnen Eiweißbausteine in der Hämolymphe*

**a) Mengenveränderungen in einigen Entwicklungsstadien.** Die Untersuchung des Verhaltens der Gesamtmenge aller Ninhydrin-positiven Stoffe in einem gegebenen Volumen Hämolymphe ergab beim Vergleich von *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tieren statistisch gesicherte Unterschiede. Die Meßwerte liegen bis zum Zeitpunkt der Puparisierung der Kontrollen bei *lgl/lgl*-Larven etwas höher als für *lgl/Cy*-Tiere und sinken bei überalterten letalen Larven unter das Niveau, das verpuppungsreifen heterozygoten Kontrollen entspricht (Abb. 2a und b). Es erschien deshalb

lohnend, zu untersuchen, ob sich die einzelnen freien Aminosäuren und Peptide allgemein ebenso verhalten wie die Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen, oder ob die Konzentrationsänderungen pro Volumeneinheit Hämolymphe bei jeder einzelnen Verbindung in den untersuchten Entwicklungsstadien spezifisch verschieden sind.

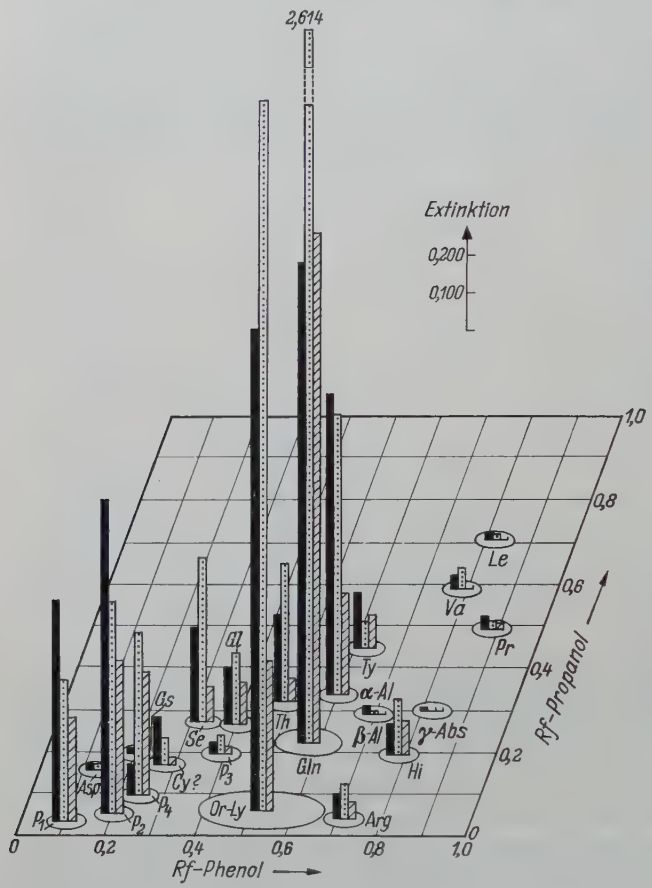



Abb. 22. Inventar der in 13,8 mm³ *Hämolymphe* auf einem zweidimensionalen Chromatogramm nachweisbaren freien Aminosäuren und Peptide und ein Vergleich ihrer Extinktionswerte für *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Larven in verschiedenen Altersstufen. Schwarze Säulen: *lgl/Cy*-Larven im Alter von 4 d 2—6 h, verpuppungsreif; punktierte Säulen: *lgl/lgl*-Larven im Alter von 4 d 2—6 h; schraffierte Säulen: *lgl/lgl*-Larven im Alter von 7 d, verpuppungsreif. $P_1$ *Peptid 1*, $P_2$ *Peptid 2*, $P_4$ *Peptid 4*, Asp *Asparaginsäure*, Gs *Glutaminsäure*, Cy ? *Cystin*, Se *Serin*, $P_3$ *Peptid 3*, Gl *Glycin*, Or-Ly *Ornithin-Lysin*, Th *Threonin*, Gln *Glutamin*, α-Al α-*Alanin*, Arg *Arginin*, Hi *Histidin*, γ-Abs γ-*Aminobuttersäure*, β-Al β-*Alanin*, Ty *Tyrosin*, Pr *Prolin*, Va *Valin*, Le *Leucin*

Es wurden zu diesem Zweck zweidimensionale Chromatogramme hergestellt. Die Standardmenge der aufgetragenen Hämolymphe betrug 13,8 mm³. Die Herstellung und Entwicklung der Chromatogramme erfolgte nach der auf S. 301 angegebenen Methode.

Beim Überblick über die Befunde läßt sich feststellen, daß sich die einzelnen freien Aminosäuren und Peptide bei den Kontrollen und ihren letalen Zuchtgeschwistern spezifisch verschieden verhalten. Die Differenzen zwischen den gemessenen Extinktionswerten sind allerdings gering, und die Streuung ist relativ groß, deshalb wurden die gefundenen Unterschiede mit Hilfe des *t*-Tests auf ihre Zuverlässigkeit geprüft (Abb. 22, Tabelle 5). Schon bei Larven im Alter von 3 Tagen und 4 Std sind Differenzen evident. Sie werden jedoch bei 24 Std älteren Larven noch deutlicher, weil sich jetzt die Kontrolltiere der Verpuppungsreife nähern und ihr Gehalt an freien Aminosäuren und Peptiden in der Hämolymphe stark abnimmt. Die *lgl/lgl*-Tiere verharren dagegen bis etwa zum Alter von 7 Tagen im Larvenstadium, und die Menge der freien Eiweißbausteine sinkt bei ihnen langsamer, wenn auch stetig ab. Es wurde nun Hämolymphe absolut gleich

alter Larven und solche entwicklungsphysiologisch gleich alter Tiere verglichen. Als Kontrolle für beide Serien dienten *lgl/Cy*-Tiere im Alter der Verpuppungsreife von 4 Tagen und 2—6 Std. Sie wurden in Beziehung gesetzt 1. zu gleich alten *lgl/lgl*-Larven und 2. zu verpuppungsreifen *lgl/lgl*-Tieren im Alter von 7 Tagen.

Wie die Abb. 22 zeigt, sind *Asparaginsäure*, *Glutaminsäure*, *β-Alanin*, *γ-Aminobuttersäure*, *Prolin*, *Arginin* und das *Peptid 3* bei Verwendung von 13,8 mm³ Hämolymphe für ein zweidimensionales Chromatogramm in so geringer Menge vorhanden, daß auftretende Konzentrationsunterschiede nicht mehr statistisch gesichert werden konnten.

Beim Vergleich von absolut gleich alten Larven ist folgendes festzustellen:

1. Es treten in gesichert größerer Menge bei *lgl/Cy*-Larven die *Peptide 1 und 2* (Abb. 23), *Cystin* (vgl. S. 322) und *Tyrosin* auf.

2. In gleicher Menge sind vorhanden, d.h. Unterschiede konnten statistisch nicht gesichert werden: *α-Alanin*, *Valin* und *Leucin*.

3. Gesichert geringere Konzentrationen bei den Kontrollen findet man für: *Serin*, *Glycin*, *Threonin*, *Ornithin-Lysin*, *Histidin*, *Glutamin* und *Peptid 4* (Tabelle 5).

Die Diskrepanz bezüglich des *Peptids 4* ist besonders auffallend, besitzen doch *lgl/lgl*-Larven die 6—7fache Menge dieser Substanz im Vergleich zu ihren heterozygoten Zuchtgeschwistern (Tabelle 5, Abb. 22 und 24). Diese Messungen wurden

Tabelle 5. *Vergleich zwischen den Extinktionswerten einiger freier Aminosäuren und Peptide in 13,8 mm³ Hämolymphe bei den Genotypen lgl/lgl und lgl/Cy*

Es sind die Durchschnittswerte und ihre mittleren Fehler angegeben. Alle Zahlenwerte wurden mit $10^3$ multipliziert. n = Anzahl der Messungen, P = Irrtumswahrscheinlichkeit, d = Tage, h = Stunden, ? = Substanz wurde nicht mit Sicherheit identifiziert ($R_f$-Wert in Phenol wie *Lanthionin*)

| Aminosäuren und Peptide | *lgl/Cy* (4 d, 2—6 h) verpuppungsreif n = 6 | *lgl/lgl* (4 d, 2—6 h) n = 6 | *P* (*t*-Test) *lgl/Cy* (4 d) *lgl/lgl* (4 d) | *lgl/lgl* (7 d) verpuppungsreif n = 10 | *P* (*t*-Test) *lgl/Cy* (4 d) *lgl/lgl* (7 d) |
|---|---|---|---|---|---|
| *Peptid 1* | 588 ± 64 | 370 ± 30 | 0,01—0,001 | 259 ± 10,0 | < 0,001 |
| *Peptid 2* | 833 ± 50 | 558 ± 38 | 0,02—0,01 | 408 ± 26 | < 0,001 |
| *Peptid 4* | 65 ± 30 | 431 ± 31 | < 0,001 | 323 ± 15,3 | < 0,001 |
| *Cystin* ? | 131 ± 4,1 | 73 ± 6,9 | 0,01—0,001 | 27 ± 2,2 | < 0,001 |
| *Serin* | 247 ± 13,1 | 428 ± 6,6 | < 0,001 | 85 ± 4,8 | < 0,001 |
| *Glycin* | 147 ± 13,0 | 184 ± 6,5 | 0,050 | 109 ± 6,2 | 0,020 |
| *Threonin* | 229 ± 27 | 364 ± 12,0 | 0,01—0,001 | 58 ± 8,3 | < 0,001 |
| *Tyrosin* | 142 ± 12,0 | 74 ± 10,0 | < 0,001 | 80 ± 7,4 | < 0,001 |
| *α-Alanin* | 786 ± 143 | 729 ± 108 | > 0,050 | 257 ± 47 | 0,01—0,001 |
| *Glutamin* | 1266 ± 145 | 2614 ± 245 | 0,01—0,001 | 1357 ± 57 | > 0,050 |
| *Ornithin-Lysin* | 1269 ± 101 | 1879 ± 126 | 0,020 | 399 ± 43 | < 0,001 |
| *Histidin* | 80 ± 15,0 | 147 ± 12,0 | 0,01—0,001 | 88 ± 4,6 | > 0,050 |
| *Valin* | 44,3 | 49,2 | — | 0 | — |
| *Leucin* | 14,6 | 13,0 | — | 0 | — |
| Summe aller Ninhydrin-positiven Substanzen | 5984 ± 392 | 8081 ± 268 | 0,01—0,001 | 3523 ± 149 | < 0,001 |

mit dem *t*-Test im Paarvergleich geprüft, da sie mit Tieren aus der gleichen Zuchtschale, d.h. also mit Individuen aus dem gleichen Milieu durchgeführt wurden. Auf diese Weise wurde die Streuung, die durch die natürliche Variabilität zwischen

den Zuchten entsteht, reduziert (Tabelle 5). Vergleicht man entwicklungsphysiologisch gleich alte Larven, so findet man:

1. *Cystin, Serin, Glycin, Threonin, Valin, Leucin, α-Alanin, Ornithin-Lysin* und die *Peptide 1* und *2* treten in gesichert größerer Menge bei *lgl/Cy*-Larven auf als bei *lgl/lgl*-Tieren.

2. Nicht gesichert verschieden ist die Konzentration von *Glutamin* und *Histidin*.

3. Nur *Peptid 4* tritt bei Kontrollen in gesichert geringerer Menge auf als bei *lgl/lgl*-Tieren.

Die statistische Sicherung erfolgte hier mittels *t*-Test im Separatvergleich. Die Variabilität zwischen den Zuchten mußte berücksichtigt werden, da die Tiere, die verglichen wurden, in verschiedenem Milieu aufwuchsen.

**b) Vergleich zwischen den beiden Mutanten *lgl* und *ltr*.** E. STUMM-ZOLLINGER (1954) untersuchte die freien Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe der Letalmutante *letal-translucida* bei verpuppungsreifen Larven (vgl. auch die graphische Darstellung bei HADORN, Letalfaktoren 1955, S. 261). Es bestehen folgende Parallelen zwischen *lgl* und *ltr*: *Peptid 1 und 2* und *Tyrosin* sind bei den homozygot letalen Larven beider Stämme in geringerer Konzentration vorhanden als bei den Kontrollen. *α-Alanin* tritt bei *ltr/ltr*- und *lgl/lgl*-Tieren in geringerer Menge auf als bei Kontrollen, wenn man entwicklungsphysiologisch gleich alte Larven vergleicht. *lgl/Cy*-Tiere haben mindestens nicht weniger *α-Alanin* als *lgl/lgl*-Larven bei Betrachtung von Individuen in absolut gleichem Alter. *Serin, Glycin, Ornithin-Lysin, Threonin* und *Glutamin* sind bei den letalen Larven beider Mutanten gegenüber den Kontrollen angereichert, wenn man für *lgl* absolut gleich alte Larven zueinander in Beziehung setzt, während für entwicklungsphysiologisch gleich alte *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Tiere diese Parallele in keinem der aufgeführten Fälle gilt.

Völlig verschieden verhalten sich *Prolin, Cystin* und *Peptid 4*. *Prolin* weist so niedrige Extinktionswerte auf bei *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Larven, daß Unterschiede statistisch nicht gesichert werden können (vgl. S. 321 und graphische Darstellung bei CHEN und HADORN 1954). *ltr/ltr*- und *ltr/+*-Tiere enthalten dagegen relativ viel *Prolin*. *Cystin* wurde bei *ltr/ltr*-Larven in relativ hoher Konzentration gefunden und ist bei *ltr/+*-Kontrollen überhaupt nicht nachweisbar, während eine Substanz, die bezüglich ihrer $R_f$-Werte für *Cystin* gehalten werden könnte, bei *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Tieren vorhanden ist. Die Extinktionswerte dieser Verbindung sind relativ niedrig, aber bei *lgl/Cy* gesichert höher als bei *lgl/lgl*-Tieren (Tabelle 5). *Peptid 4* ist bei *ltr/ltr*-Larven nicht nachweisbar und bei Kontrollen in sehr geringer Menge vorhanden, während *lgl/lgl*-Larven durch relativ hohe Extinktionswerte für *Peptid 4* charakterisiert sind, und die Kontrollen analog zu *ltr/+*-Tieren sehr wenig *Peptid 4* enthalten (Abb. 24). E. STUMM-ZOLLINGER berechnete auf Grund von Eichkurven die absolute Konzentration der einzelnen Ninhydrin-positiven Stoffe in Gewichtseinheiten ($\gamma$) und stellte eine relativ geringe Empfindlichkeit des *Prolins* und *Cystins* gegenüber Ninhydrin fest. Deshalb erhielt sie für beide Substanzen große absolute Mengen.

**c) Ansätze zur Deutung der Ergebnisse.** In Tabelle 5 und Abb. 22 fallen besonders die Aminosäuren und Peptide auf, die bei Kontrollen in größerer Menge vorkommen als bei letalen Larven, nämlich *Cystin, Tyrosin* und die *Peptide 1 und 2*.

*Cystin* spielt zusammen mit *Cystein* bei der Zellatmung eine große Rolle und könnte deshalb bei den stoffwechselphysiologisch aktiveren Heterozygoten (vgl. S. 319) in größerer Menge vorkommen als bei den *lgl/lgl*-Larven. Der Fleck „*Cy*" konnte jedoch nicht mit genügender Sicherheit als *Cystin* identifiziert werden. *Tyrosin* ist am Aufbau des Melanins beteiligt, das zur Ausfärbung des Puparium benötigt wird. Für die langsamer und unter Umständen unvollständig vor sich gehende Bräunung der Chitinhülle bei Pseudopuppen könnte neben anderen Deutungsmöglichkeiten auch die geringere Menge an *Tyrosin* in der Hämolymphe und im Körperextrakt (vgl. S. 313) bei *lgl/lgl*- gegenüber *lgl/Cy*-Tieren in Betracht gezogen werden. Die *Peptide 1 und 2* (Abb. 23) werden vielleicht als Vorstufen zum Aufbau von Eiweißen während der Puparium bildung benötigt (vgl. S. 319). Beide Substanzen werden zunächst auch bei *lgl/lgl*-Larven vom mittleren 3. Larvenstadium an bis zum Alter von etwa 4 Tagen vermehrt, wenn auch in geringerem Maße als bei *lgl/Cy*-Tieren. Ihre Extinktionswerte sinken aber bei überalterten *lgl/lgl*-Larven im Laufe weniger Tage stark ab, was möglicherweise auf ein Aussetzen der Eiweißsynthese hindeutet.

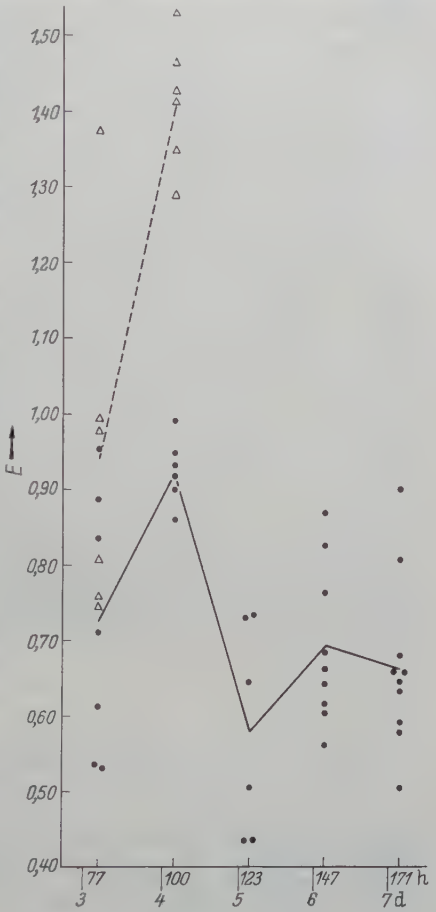



Abb. 23. Konzentration der *Peptide 1 und 2* (zusammengefaßt) in 13,8 mm³ *Hämolymphe* während der Entwicklung von *lgl/lgl*- und *lgl/Cy*-Larven. Abszisse: Larvenalter in Stunden (h) und Tagen (d). Ordinate: Extinktion. Zeichen wie in Abb. 2a

Der auffallend geringe Gehalt der beiden Peptide bei 5 Tage alten *lgl/lgl*-Larven könnte darauf zurückzuführen sein, daß Larven im Alter zwischen 5 und 6 Tagen auf frisches Futter gesetzt wurden und 5tägige Tiere schon nicht mehr die optimale Menge Hefe auf dem Futter vorfanden (vgl. auch Abb. 2b).

Von Interesse ist ferner die Sonderstellung, die das *Peptid 4* einnimmt. Es verschwindet offensichtlich (Abb. 24), wenn die heterozygoten Larven verpuppungsreif sind. Dieselbe Feststellung machten Chen und Hadorn (1955) für normale *Drosophila*-Larven. Schon im mittleren 3. Larvenstadium zeigen Letale und Kontrollen eine große Diskrepanz bezüglich der Konzentration dieses Peptids. Die Abnahme seiner Extinktionswerte ist bei beiden Genotypen im Alter zwischen 77 und 100 Std sehr intensiv, bei älteren *lgl/lgl*-Larven jedoch stark verlangsamt, was wiederum mit dem Einstellen des Eiweißaufbaues erklärt werden könnte.

Die Konzentration von α-*Alanin* ist weitgehend vom Ernährungszustand der untersuchten Tiere abhängig. Bereits 2 Std langes Hungern setzt sie merklich herab. Nach Chen und Hadorn (1955) erhöht Verfütterung von Rohrzucker bei

der Mutante *lme* die Konzentration an *α-Alanin*. Während des Migrationsstadiums wird bei *Drosophila*-Larven die Nahrungsaufnahme nach und nach eingestellt, je näher der Zeitpunkt der Verpuppung heranrückt. Deshalb wahrscheinlich sinkt die Konzentration des *α-Alanins* in der Hämolymphe in diesem Zeitraum bei *lgl/lgl*-Larven in sehr starkem Maße.

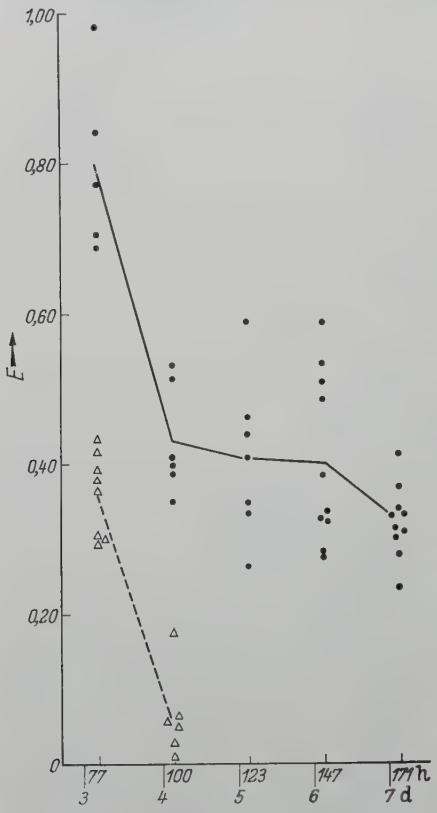



Abb. 24. Konzentration von *Peptid 4* in 13,8 mm³ *Hämolymphe* während der Entwicklung von *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Larven. Abszisse: Larvenalter in Stunden (h) und Tagen (d). Ordinate: Extinktion. Zeichen wie in Abb. 2a

Das Verhalten der übrigen Ninhydrin-positiven Substanzen (Abb. 22) könnte auf einem bei 4tägigen *lgl/lgl*-Larven zwar gehemmten aber mit gleich alten Kontrollen parallel laufenden Eiweißaufbau beruhen, der mit zunehmendem Alter der *lgl/lgl*-Individuen stetig an Intensität abnimmt. Der Betriebsstoffwechsel müßte infolge der sich mehr und mehr verstärkenden Freßunlust der migrierenden, verpuppungsreifen Larven in steigendem Maße von akkumulierten Aminosäuren und Peptiden bestritten werden (vgl. S. 319). Über die möglichen Ursachen der relativ besonders starken Akkumulation von *Glutamin* wurde auf S. 319 berichtet.

Abgesehen von dem isoliert stehenden Verhalten des *Peptids 4*, des *Prolins* und des *Cystins* scheint sich die Störung im Aminosäurestoffwechsel bis zum Alter verpuppungsreifer Kontrollen bei den beiden Mutanten *lgl* und *ltr* von *Drosophila melanogaster* in der Hämolymphe ähnlich auszuwirken. Das divergierende Verhalten der als Larven überlebenden *lgl/lgl*-Tiere könnte mit der minimal um 3 Tage verzögerten Puparisierung in Zusammenhang stehen.

## IV. Untersuchung des Proteingehaltes mittels Papierelektrophorese

### *1. Quantitative Bestimmung in der Hämolymphe während der Entwicklung im 3. Larvenstadium*

Die papierchromatographischen Untersuchungen über den Aminosäure- und Peptidstoffwechsel der Mutante *lethal giant larvae* haben zu Ergebnissen geführt, die eine Störung der Eiweißsynthese wahrscheinlich machen (S. 319 und 322). Es wurde deshalb anschließend versucht, auf papierelektrophoretischem Wege Auskunft über das qualitative und quantitative Verhalten der Proteine bei der *lgl*-Mutante zu erhalten. Die Methodik dieser Untersuchungen wurde auf S. 301 beschrieben. Das Alter der Versuchstiere betrug 3d 4h, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d und 9d (d = Tage, h = Std).

In Übereinstimmung mit den Resultaten von Wunderly und Gloor (1953) und Chen (1956) konnten in dieser Arbeit bei Kontrolltieren 2 Eiweißfraktionen nachgewiesen werden. Während die *Fraktion B* bei beiden Genotypen in allen

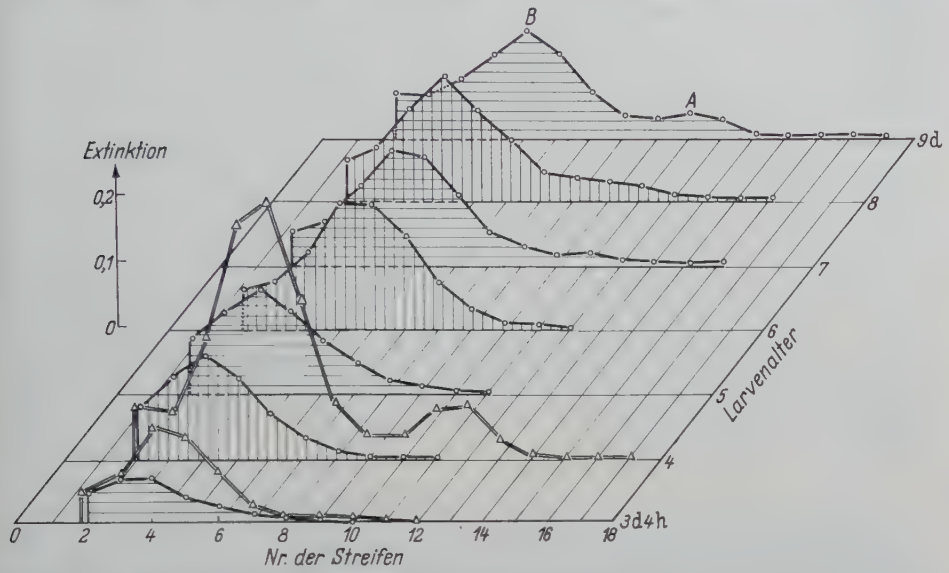



Abb. 25. Das qualitative und quantitative Verhalten der Proteine in 16,55 mm³ Hämolymphe auf Elektrophoresediagrammen von *lgl/lgl*-Larven —○— und *lgl/Cy*-Kontrollen =△=. Abszisse: Nummern der einzelnen Querstreifen der Diagramme (Streifenbreite 0,5 cm). Ordinate: Extinktion. z-Achse: Larvenalter in Tagen (d). *A* und *B*: Proteinfraktionen. Die Symbole bezeichnen Durchschnittswerte aus 5—9 Messungen

untersuchten Entwicklungsstadien vorkommt, läßt sich die durch geringe Konzentration ausgezeichnete *Fraktion A* nur bei älteren Larven nachweisen, die der Verpuppungsreife entgegenschreiten. Für die *lgl/Cy*-Tiere ist dies der Fall, wenn die Larven $3^1/_2$ bis 4 Tage alt sind. In der Hämolymphe von letalen Larven tritt die 2. Fraktion erstmals in geringer Menge bei

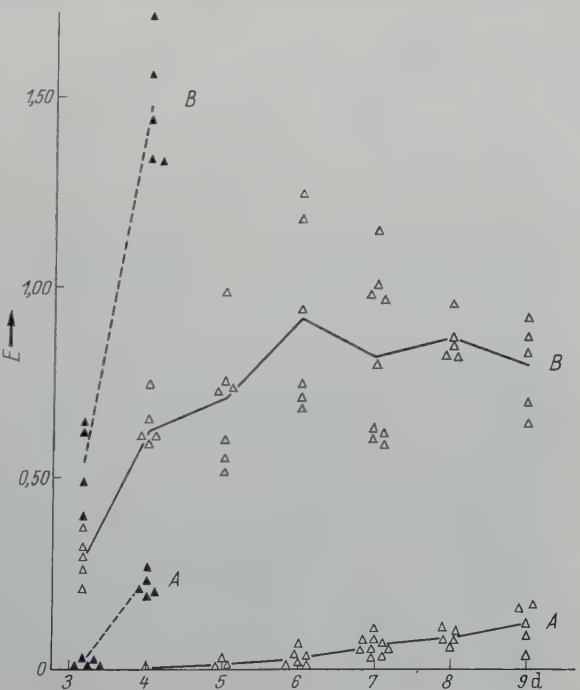



Abb. 26. Gehalt der Bromphenol-blaupositiven Substanzen in 16,55 mm³ *Hämolymphe*. —△— Fraktionen A und B von *lgl/lgl*-Larven, - -▲- - Fraktionen *A* und *B* von *lgl/Cy*-Larven. Die Grenze zwischen den beiden Fraktionen wurde bei den Streifennummern 9 und 10 gezogen (vgl. Abb. 25). Abszisse: Larvenalter in Tagen (d). Ordinate: Extinktion. Die Symbole bezeichnen Einzelmessungen

6 Tage alten Tieren in Erscheinung (Abb. 25). Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß *lgl/lgl*-Tiere im Alter von 7 Tagen an Puparien zu bilden beginnen.

Überblickt man die graphische Darstellung der Abb. 25, so fällt die sprunghafte Zunahme der beiden Eiweißfraktionen bei den Kontrollen während des mittleren und späten 3. Larvenstadiums gegenüber den Diagrammen der Letalen mit langsamem Anstieg der Meßwerte über größere Zeiträume hinweg auf. In allen untersuchten Entwicklungsstadien enthalten Kontrollen im Vergleich zu gleich alten Letalen mehr Hämolymph-Eiweiße (Abb. 26). Die *lgl/Cy*-Tiere haben im mittleren 3. Larvenstadium durchschnittlich fast doppelt so hohe Extinktionswerte als ihre gleich alten letalen Geschwister. Bei 4 Tage alten Larven beträgt der Unterschied fast das Dreifache. Bei Kontrolltieren im Alter zwischen 3—4 Tagen nimmt die Gesamtmenge der mit unserer Methode erfaßbaren Proteine in der Hämolymphe um das Dreifache zu, bei *lgl/lgl*-Larven steigt sie nur um das Doppelte. Der Eiweißgehalt der Körperflüssigkeit steigt bei *lgl/lgl*-Larven im Alter von 4—6 Tagen noch an, erreicht aber die Höhe desjenigen 4 Tage alter Kontrolltiere nie. Bei letalen Larven die das Alter von 6 Tagen überschreiten, macht sich eine leichte Abnahme der *Proteinfraktion B* bemerkbar, während die *Fraktion A* eher eine ansteigende Tendenz aufweist.

### *2. Die Eiweißfraktionen des Körperextraktes in einigen Entwicklungsstadien*

Die technische Schwierigkeit ganze in Wasser homogenisierte *Drosophila*-Larven der Elektrophorese zu unterwerfen, besteht in einer gegenüber Hämolymphe noch erhöhten Ten-

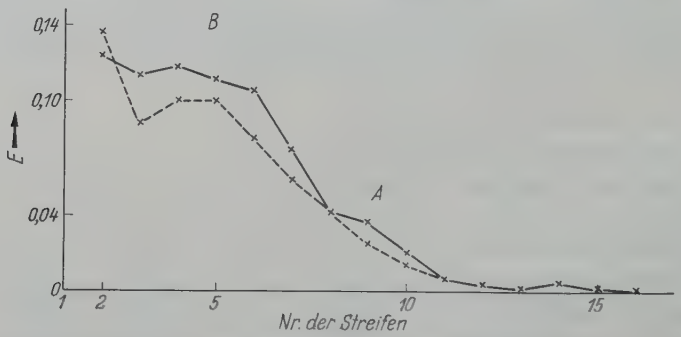



Abb. 27. Elektrophoresediagramm eines *Homogenats* aus 50 Larven im Alter von 3 d, 2—7 h. Abszisse: Nummern der einzelnen Querstreifen, Streifenbreite 0,5 cm. Ordinate: Extinktion. --×-- *lgl/lgl*-Larven, —×— *lgl/Cy*-Larven. Die Symbole bezeichnen je eine Einzelmessung

denz zu Melanisierung. Die Schwärzung des Startstreifens auf dem Elektrophoresepapier ist regelmäßig bei Untersuchung von *lgl/lgl*-Tieren schwächer als bei *lgl/Cy*-Larven und ist kurz vor der Puparisierung der Kontrolltiere besonders intensiv. Diese Tatsache ist mit dem Maximum der Tyrosinaseaktivität bei *Drosophila*-Wildlarven im Stadium der Verpuppungsreife gut vereinbar (OHNISHI 1953). Beim Zentrifugieren des Homogenats sinkt nur ein Teil der festen Substanz ab, während sich eine Schicht, die spezifisch leichter ist als Wasser und aus fettartigen Stoffe bestehen dürfte, an der Oberfläche der Lösung ansammelt (DANNEEL 1943). Diese Oberflächenschicht schützt die darunterliegende Flüssigkeit vor der Einwirkung des KCN und vor Luftsauerstoff. Melanisierung tritt regelmäßig erst $^1/_2$ bis 1 Std nach Anlegen des elektrischen Stromes ein. Ich behandelte das Homogenat daraufhin vor dem Zentrifugieren mit KCN und rührte die Oberflächenschicht mehrmals auf. Auf diese Weise wurde die Schwärzung des Elektrophoresestreifen wesentlich verringert.

Auch im Körperextrakt sind 2 Eiweißfraktionen nachweisbar, die sich ähnlich verhalten wie diejenigen in der Hämolymphe (Abb. 27 und 28). Die *Proteinfraktion B* ist im Körperextrakt von *lgl/lgl*-Larven und *lgl/Cy*-Kontrollen in beiden untersuchten Entwicklungsstadien vorhanden. Die *A-Fraktion* dagegen ist bei 3-tägigen Kontrollen nur in Spuren nachweisbar und fehlt bei gleich alten letalen Larven vollständig. Sie tritt bei verpuppungsreifen Kontrollen in größerer Menge auf, läßt sich aber bei gleich alten letalen Tieren wiederum nicht nachweisen (Abb. 27 und 28). Hämolymphe und Körperextrakt scheinen sich also grob qualitativ bezüglich der beiden mit unseren Methoden nachweisbaren wasserlöslichen Eiweißfraktionen bei Letalen und Kontrollen analog zu verhalten.

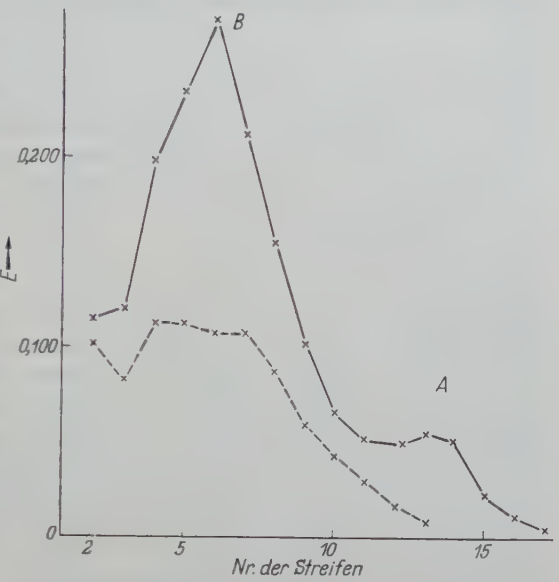



Abb. 28. Elektrophoresediagramm eines *Homogenats* aus 25 Larven im Alter von 4 d, 2—6 h. Die Heterozygoten sind verpuppungsreif. Legende wie in Abb. 27. Breite der einzelnen Querstreifen 0,4 cm

### *3. Vergleich zwischen den beiden Mutanten lgl und ltr*

Homozygote *ltr/ltr*-Tiere scheinen nach CHEN (1956) schwerere Störungen im Eiweißstoffwechsel aufzuweisen als *lgl/lgl*-Tiere. Der Gesamtproteingehalt pro Volumeneinheit Hämolymphe ist bei 96 Std alten *ltr/+*-Larven etwa 7,5mal höher als bei 120 Std alten *ltr/ltr*-Individuen, bei verpuppungsreifen *lgl/Cy*-Tieren dagegen nur etwa 3mal höher als bei gleich alten *lgl/lgl*-Larven. Bei *lgl/lgl*-Homozygoten steigt die Eiweißmenge noch an, bis die Tiere etwa 6 Tage alt sind. Die Proteinmenge im Blut pro Volumeneinheit differiert deshalb bei entwicklungsphysiologisch gleich alten *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tieren kurz vor der Puparisierung nur noch um Werte, die sich wie $lgl/lgl : lgl/Cy = 2 : 1$ verhalten. Berücksichtigt man die Akkumulation von Hämolymphe bei den letalen Tieren gegenüber den Kontrollen, so enthält die gesamte Blutmenge eines einzelnen *ltr/ltr*-Tieres immer noch 2,5mal weniger Eiweiße als die eines Kontrolltieres, weil die letale Larve rund 3mal mehr Körperflüssigkeit speichert als die *ltr/+*-Larve. Bei 4 Tage alten *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tieren verhält sich die Lymphmenge wie 3 : 2 (Tabelle 2), und die gesamte Körperflüssigkeit wäre pro Tier bei *lgl/lgl*-Larven noch etwa 1,8mal ärmer an Eiweißen als bei *lgl/Cy*-Kontrollen. Für entwicklungsphysiologisch gleich alte Tiere des *lgl*-Stammes bedeutet dies bei einem Verhältnis der Hämolymphemenge von $lgl/lgl : lgl/Cy$ wie etwa 3 : 1 (Tabelle 2), daß die Gesamtmenge des Blutes der Kontrollen sicher nicht mehr Eiweiße pro Tier enthält als die der *lgl/lgl*-Larven. Die *A-Fraktion* ist bei *ltr/ltr*-Larven im Alter zwischen 84—96 Std in geringerer Menge vorhanden als bei *lgl/lgl*-Larven im Alter von 7—9 Tagen.

*4. Deutungsmöglichkeiten*

Die papierelektrophoretische Untersuchung der Proteine in einem gegebenen Volumen Hämolymphe und im Körperextrakt pro Tier hat bei *lgl/lgl*-Larven eine geringere Konzentration ergeben als bei Kontrollen. Die Eiweißsynthese scheint also bei der Mutante *lgl* in ihrer Intensität gehemmt zu sein. Die wasserlöslichen Eiweiße der beiden Genotypen *lgl/lgl* und *lgl/Cy* im Körperextrakt unterscheiden sich grob qualitativ nicht von denen der Hämolymphe. Die *Proteinfraktion A* tritt bei *lgl/lgl*-Tieren verspätet auf. Es könnte ihr eine spezielle Bedeutung bei der Puparisierung zukommen. Mit der Hemmung in der Intensität scheint somit eine zeitliche Verzögerung des Ablaufes der Proteinwechselvorgänge bei *lgl/lgl*-Homozygoten gekoppelt zu sein.

Die leichte Abnahmetendenz der *Proteinfraktion B* in der Hämolymphe bei älteren *lgl/lgl*-Larven nach Überschreitung der Altersgrenze von 6 Tagen könnte darauf beruhen, daß die letalen Individuen mit relativ hohem Gehalt an *Fraktion B* in der Hämolymphe früh, im Alter von 7—8 Tagen nach der Eiablage, zur Puparisierung schreiten, während *lgl/lgl*-Larven mit unterschwelligem Eiweißgehalt nur spät oder nie dazu imstande sind. Bei Untersuchung mehr als 8 Tage alter *lgl/lgl*-Larven würde daher eine Auslese nach konstitutionell immer stärker geschädigten Tieren vorgenommen. Im Gegensatz dazu scheint die *Fraktion A* bei überalterten *lgl/lgl*-Larven nicht abzunehmen, wenn auch die Streuung der Extinktionswerte bei 9 Tage alten Larven zunimmt.

## V. Diskussion

Ein Vergleich der in dieser Arbeit für *lgl* erhobenen Befunde mit denjenigen der beiden Letalmutanten *ltr* und *lme* zeigt, daß hier drei ganz verschiedene Schädigungsmuster des Eiweißstoffwechsels vorliegen. Während die Arbeiten von Schmid (1949) und Chen und Hadorn (1955) für *lme* in klarer Weise demonstrieren, daß die Eiweißverdauung verunmöglicht ist, wurde für die Mutante *ltr* nachgewiesen, daß der Eiweißaufbau entscheidend gestört ist (Hadorn und Stumm-Zollinger 1953, Stumm-Zollinger 1954, Chen 1956). Bei der Mutante *lgl* lassen sich die Ergebnisse nicht so einfach interpretieren. Der Eiweißstoffwechsel scheint bei *lgl/lgl*-Tieren während der Entwicklung vom mittleren 3. Larvenstadium bis zur Bildung von Pseudopuppen zeitlich verzögert und in der Intensität seiner Abläufe gehemmt zu sein. Für eine zwar mit den Prozessen bei Kontrollen *parallel laufende*, aber *gehemmte Eiweißsynthese* bei *lgl/lgl*-Larven bis zum Alter von 4—5 Tagen spricht die Speicherung von *Glutamin* und *Ornithin-Lysin*, die geringere Konzentration der *Peptide 1 und 2* (Abb. 22, Tabelle 5), der niedrigere Gehalt der *Proteine* (Abb. 26) und die langsamere Mengenabnahme des Peptids 4 (Abb. 24) im *Blut* pro Volumeneinheit und die Akkumulation der Ninhydrin-positiven Substanzen (Abb. 1), speziell des *Glutamins* (Abb. 15) und der *Peptide 1, 2 und 4* (Abb. 3 und 5) im *Körperextrakt* pro Tier. Bei älteren, als Larven überlebenden *lgl/lgl*-Tieren scheint die Eiweißsynthese mehr und mehr reduziert zu werden. Die migrierenden, freßunlustigen Larven müßten dann von der Energie der in ihrem Körper gespeicherten freien Aminosäuren und Peptide leben, wenn der Eiweißspiegel ihrer *Hämolymphe* nicht absinken soll. Für diese Deutung sprechen folgende Befunde: Die Abnahme des Gehaltes an *Ninhydrin-positiven Substanzen*, einschließlich der *Peptide 1* und *2* im *Körperextrakt* (Abb. 1)

und in der Hämolymphe (Abb. 2a und b), die annähernd konstant bleibende Menge der *Eiweiße* im *Blut* pro Volumeneinheit bei letalen Larven im Alter von 6 Tagen an (Abb. 26), sowie die sehr geringe Abnahme des Gehaltes an *Peptid 4* (Abb. 24). Die *zeitliche Verzögerung der Eiweißstoffwechselvorgänge* wird besonders deutlich im verspäteten Erscheinen der *Proteinfraktion A* (Abb. 25), im Auftreten der maximalen Konzentration an *Proteinen* im *Blut* pro Volumeneinheit erst bei 6 Tage alten Letalen (Abb. 26), in der Entstehung des Kurvengipfels der gesamten Ninhydrin-positiven Substanzen im Körperextrakt bei frühestens 5 Tage alten *lgl/lgl*-Tieren (Abb. 1) und im Erscheinen des Maximalgehaltes von *Tyrosin* (Abb. 13), *Dopa* (Tabelle 4), *Kynurenin* und *Tryptophan* (Tabelle 3) bei letalen Tieren erst während der Puppariumbildung. Gestützt werden die angeführten Deutungsmöglichkeiten durch Untersuchungen von Chen (1951), der für *lgl/lgl*-Larven im Alter von 4—5 Tagen die Höchstwerte für den Sauerstoffverbrauch und das Trockengewicht registrierte. In diesem Alter scheint der Gesamtstoffwechsel der *lgl/lgl*-Homozygoten seine größte Intensität erlangt zu haben.

Das Verhalten einiger Aminosäuren, wie *Glutaminsäure*, *α-Alanin*, *γ-Aminobuttersäure*, *Taurin*, *β-Alanin*, *Valin*, *Leucin* und der Substanz „*Marine-blau*" im Körperextrakt (S. 319), sowie „*Cystin*" (?) und *Tyrosin* in Hämolymphe (S. 319—323) läßt sich allerdings schwer in diese allgemeine Hypothese einordnen.

In Abb. 29c ist das Mengenverhältnis der Ninhydrin-positiven Substanzen (As+Pd) zu dem der Proteine (Prot) in einem gegebenen *Volumen Hämolymphe* dargestellt. Die angegebenen Zahlen lassen keinen Schluß auf die wirklichen Absolutwerte zu, da keine Eichung der Extinktionswerte auf entsprechende Gewichtseinheiten vorgenommen wurde. Immerhin ist aus dem Kurvenverlauf ersichtlich, daß entwicklungsphysiologisch gleich alte *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tiere ein ähnliches Mengenverhältnis von (As+Pd)/Prot aufweisen. Die Summe (As + Pd) + Prot differiert dagegen bei entwicklungsphysiologisch gleich alten letalen Tieren und Kontrollen stark (Abb. 29b). Es könnte demnach zur Puparіumbildung das *Mengenverhältnis (As+Pd)/Prot* von Wichtigkeit sein, nicht aber die Summe der organischen, stickstoffhaltigen Verbindungen im *Blut pro Volumeneinheit*. Zum Vergleich ist auf Abb. 29a noch einmal der Gehalt der Aminosäuren und Peptide im *Körperextrakt pro Tier* dargestellt, der zeigt, daß im Zeitpunkt der Verpuppungsreife die Menge der freien Ninhydrin-positiven Substanzen bei *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Larven annähernd gleich groß ist.

Über die Ursachen dieser Anomalien im Eiweißstoffwechsel bei der Mutante *lgl* läßt sich nach vorliegenden Untersuchungen nichts aussagen. Auch die Frage, ob der Faktor *lgl* primär oder sekundär in den Eiweißstoffwechsel eingreift, läßt sich nicht entscheiden. Die bisher von anderen Autoren beschriebenen Schädigungen der *lgl/lgl*-Homozygoten werden bereits spätestens im Laufe des 2. Larvenstadiums manifest, also zu einem Zeitpunkt, in dem *lgl/lgl-* und *lgl/Cy*-Tiere nur auf Grund von eingehendem histologischen Studium voneinander unterschieden werden können (Literaturangaben finden sich in der Einleitung).

R. M. Welch (1957) stellte auf Grund seiner Untersuchungen (zit. auf S. 300) die Hypothese auf, daß bei der Mutante *lgl primär* eine Schädigung vorliege, die mit der *DNS-Synthese* in Zusammenhang stehe, und daß der hormonale Effekt der *Ringdrüsenschädigung sekundär* diesen Primärdefekt überlagere und auf ihn zurück-

zuführen sei. Diese Annahme übergeht die Resultate anderer Autoren und müßte erst durch Untersuchung des *DNS*-Gehaltes sehr junger Entwicklungsstadien überprüft werden. Bekanntlich wirkt der *lgl*-Faktor diphasisch (HADORN 1955), wobei ein Teil der letalen Tiere als Embryo zugrunde geht, und die ersten Anzeichen einer Schädigung der Speicheldrüsen zeigen sich ebenfalls schon gegen Ende der Embryogenese (GROB 1946). Nur wenn *lgl*/*lgl*-Tiere bereits während der Embryonalentwicklung bezüglich ihres *DNS*-Gehaltes Unterschiede gegenüber den Kontrollen aufweisen, läßt sich die Hypothese von WELCH vertreten. Es ist allerdings eindrucksvoll, daß WELCH auch bei Organen, die morphologisch nicht geschädigt

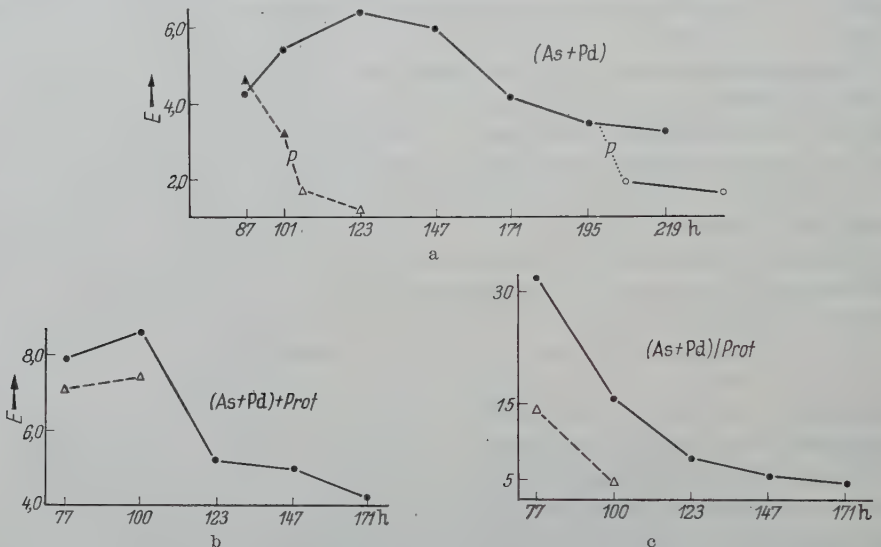



Abb. 29a—c. a Die Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen (*As + Pd*) im *Körperextrakt* pro Tier. Angegeben sind die Mittelwerte der Abb. 1. Zeichen wie in Abb. 1; b Die Summe der freien Aminosäuren und Peptide und der Proteine (*As + Pd*) + *Prot* pro Volumeneinheit *Hämolymphe*. Zeichen wie in Abb. 2; c Der Quotient aus der Menge der Ninhydrin-positiven Substanzen und der Menge der Proteine (*As + Pd*)/*Prot* pro Volumeneinheit *Hämolymphe*. Zeichen wie in Abb. 2. Die Ordinate gibt das Zahlenverhältnis der Extinktionswerte an

erscheinen, wie in der Epidermis, in Teilen des Darmtraktus oder in den Corpora allata Unterschiede im *DNS*-Gehalt findet, zumal sich speziell die Corpora allata vollständig imaginal differenzieren können (M. VOGT 1947).

Die *Akkumulation* von *Hämolymphe* scheint ein *Sekundärphän* zu sein, das mit der Anreicherung der Ninhydrin-positiven Substanzen in Zusammenhang stehen könnte, denn schon bei 77stündigen *lgl*/*lgl*-Larven ist die Menge der freien Aminosäuren und Peptide im Blut pro Volumeneinheit leicht erhöht (Abb. 2b), während in diesem Entwicklungsstadium bei Letalen noch weniger Hämolymphe vorhanden ist als bei Heterozygoten (Tabelle 2). Die Körpergröße ist bei 77stündigen Letalen ebenfalls geringer als bei Kontrollen (GLOOR 1943).

Hypothetisch bietet sich folgende Möglichkeit an, die einzelnen Anomalitäten im Eiweißstoffwechsel der *lgl*/*lgl*-Tiere kausal zu verknüpfen: Normale Ringdrüsen, in *lgl*/*lgl*-Larven implantiert, lösen bei den letalen Tieren Beschleunigung der Puppariumbildung aus (HADORN 1937a). Es liegt nahe anzunehmen, daß sich die Unterfunktion der Hauptzellen der *lgl*-Ringdrüsen mindestens auf die Teilprozesse

des Eiweißstoffwechsels, die mit der Puparisierung in Zusammenhang stehen, hemmend auswirkt. — Diese Annahme könnte geprüft werden durch Injektion von Ecdyson in *lgl/lgl*-Larven und anschließende papierchromatographische oder elektrophoretische Untersuchung der behandelten Tiere. — Die *Hemmung des Eiweißstoffwechsels* wirkt sich zunächst bezüglich der Intensität der Proteinsynthese in einer Anreicherung von freien Aminosäuren und Peptiden und einem niedrigen Eiweißgehalt im Blut pro Volumeneinheit bei Letalen aus. Kompensatorisch wird nun, zur Verdünnung des Blutes auf eine annähernd normale Konzentration an Ninhydrin-positiven Substanzen pro Volumeneinheit, die Flüssigkeitsmenge im Körper der *lgl/lgl*-Tiere vermehrt. Die Hemmung der Proteinsynthese wirkt sich auch zeitlich aus und erfordert eine Verlängerung der Migrationsphase der letalen Larven um mindestens 3 Tage. Während dieser Entwicklungsphase fressen die *lgl/lgl*-Tiere nur noch wenig und können die Akkumulation von Flüssigkeit nicht mehr rückgängig machen. Falls der Gehalt an freien Aminosäuren und Peptiden im ganzen Tier dem Niveau verpuppungsreifer, normaler Larven angeglichen werden muß, damit die Puppariumbildung vor sich gehen kann, müßten die letalen Larven die Konzentration an Ninhydrin-positiven Substanzen pro Volumeneinheit Hämolymphe unter das Normalniveau herabsetzen. Dies könnte geschehen, falls die *lgl/lgl*-Tiere während der Migrationsphase die in ihrem Körper gespeicherten freien Aminosäuren und Peptide direkt zur Energielieferung angreifen und die synthetisierte Eiweißmenge im Blut unangetastet lassen. Denn die verpuppungsreife *lgl/lgl*-Larve ist gegenüber dem entwicklungsphysiologisch gleich alten Kontrolltier gekennzeichnet durch eine Akkumulation von Hämolymphe, die pro Volumeneinheit einen erniedrigten Gehalt an freien Aminosäuren und Peptiden und Eiweißen aufweist. Die letale Larve als ganzes enthält jedoch etwa gleich viel Aminosäuren und Peptide wie die normale, verpuppungsreife Kontrolle.


## Summary

The amounts of free amino acids, polypeptides and proteins in the third instar larvae and early pupae of the genotypes *lgl/lgl* and *lgl/Cy (lgl = lethal giant larvae)* of *Drosophila melanogaster* have been studied quantitatively by means of paper chromatography and paper electrophoresis. The following results have been obtained:

A. Behaviour of the total amount of ninhydrine positive substances and of the total quantity of proteins:

1. The total amount of free amino acids and peptides in body extracts per individual is temporarily increased to an abnormally high value in *lgl/lgl* larvae until the age of six days, but resembles *lgl/Cy* controls in mature larvae and pseudopupae (Fig. 1).

2. The hemolymph of lethal larvae at the age of 3—$4^1/_2$ days shows a sligthly higher, in older ones a much lower concentration of ninhydrine positive substances than that of the controls (Fig. 2a, 2b).

3. The amount of proteins in hemolymph per unit of volume is lower in lethals than in controls. It does not change significantly in older *lgl/lgl* individuals after it has reached a maximum in larvae aged six days (Fig. 2b).

4. There is an abnormal accumulation of hemolymph in the lethals. At the age of four days the amount of hemolymph shows a proportion of $3 : 2 = lgl/lgl : lgl/Cy$, whereas in mature larvae at the same physiological age of development the proportion is $3 : 1 = lgl/lgl : lgl/Cy$ (Table 2).

B. Behaviour of individual ninhydrine positive substances and of separate protein fractions:

1. The quantities of aspartic acid, serine, glycine, threonine, ornithine-lysine, arginine, glutamine, proline, histidine and peptides 1—4 are temporarily strongly increased in the body extracts of lethals (Fig. 3—6, 8, 10, 11, 15—18).

2. Tyrosine, dopa, tryptophane, kynurenine and taurine reach their maximal quantity in the body extracts of lethal animals later than those in the controls (Fig. 9, 13, Table 3, 4).

3. In the body extracts of the middle third instar controls $\alpha$-alanine, glutamic acid and $\gamma$-aminobutyric acid are present in higher amount than in lethals. Their content does not increase abnormally in older *lgl/lgl* larvae (Fig. 7, 12, 21).

4. Valine, leucine and $\beta$-alanine are present only in small amount and show minimal extinctions near zero in larvae at the age of seven to eight days. Pseudopupae however contain larger amounts of the three substances (Fig. 14, 19, 20).

5. In a given volume of hemolymph of lethals at the age of 100 hours there is a statistically significant higher amount of peptide 4, serine, glycine, threonine, glutamine, ornithine-lysine and histidine than in the controls of the same age. The amounts of $\alpha$-alanine, valine and leucine are nearly the same. However the hemolymph of lethals contains lower quantities of „cystine“ ( ?), tyrosine and of the peptides 1 and 2 than that of *lgl/Cy* larvae (Fig. 22, Table 5).

6. Comparing mature larvae of the same physiological age of development, it is evident that a given volume of hemolymph in lethals contains only peptide 4 in larger amounts than in controls. The amount of glutamine and histidine is not statistically different, while the peptides 1 and 2, "cystine" ( ?), serine, glycine, threonine, tyrosine, $\alpha$-alanine, ornithine-lysine, valine and leucine show a lower value in the hemolymph of lethals than in controls (Fig. 22, Table 5).

7. By using the present method the proteins could be separated into two fractions. Fraction B was found in lethals and controls in all the stages of development investigated. Fraction A however first appears in mature larvae, that is in controls at the age of four days and in lethals of the age of six to seven days (Fig. 25, 27, 28).

8. The protein metabolism in the *lgl* homozygotes appears in general to be reduced parallel to the delayed development of this lethal genotype. It is discussed in detail how such an abnormal development affects differently the quantities of amino acids, peptides and proteins.

Herrn Professor E. Hadorn danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, Herrn Dr. P. S. Chen für die Einführung in die chemische, Hern Dr. H. Burla in die statistischen Methoden und Herrn Dr. G. Anders für Beratung bei Abfassung des Manuskripts.

## Literatur

Auclair, J. L., et R. Dubreuil: Etude sur les acides aminés libres de l'hémolymphe des insectes par la méthode de chromatographie sur papier filtre. Canad. J. Zool. **31**, 30 (1953). — Baldwin, E.: Biochemie, Einführung in ihre Dynamik. Weinheim: Verlag Chemie GmbH.

1957. — Benz, G.: Quantitative Veränderungen der Aminosäuren und Polypeptide während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **30**, 498 (1955). — Untersuchungen über die Wirkung der Letalfaktoren *letal-bluter (lbl)* und *lethal-polymorph (lpm)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 78 (1957). — Block, R., R. LeStrange and G. Zweig: Paper chromatography. New York: Academ. Press Inc. Publishers 1952. — Bode, F. H., H. J. Hübner, H. Brückner u. K. Hoeres: Eine einfache, quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Papierchromatogramm. Naturwiss. **39**, 525 (1952). — Boissonnas, R. A.: Dosage colométrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier. Helv. chim. Acta **33**, 1975 (1950). — Brush, M. K., R. K. Boutwell, A. D. Barton and C. Heidelberger: Destruction of amino acids during fiter paper chromatography. Science **113**, 2923 (1951). — Butenandt, A., P. Karlson u. W. Zillig: Über Dioxypiperazine aus Puppen des Seidenspinners *Bombyx mori*. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **288**, 279 (1951). — Chen, P. S.: A comparative study of the oxygen consumption in the three lethal mutants "*ltr*", "*lgl*" and "*lme*" of *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 38 (1951). — Elektrophoretische Bestimmung des Proteingehaltes im Blut normaler und letaler *(ltr)* Larven von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **63**, 216 (1956). — Chen, P. S., u. E. Hadorn: Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Hämolymphe von *Drosophila*, *Ephestia* und *Corethra*. Rev. suisse Zool. **61**, 437 (1954). — Zur Stoffwechselphysiologie der Mutante *letal-meander (lme)* von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **62**, 338 (1955). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie GmbH. 1953. — Danneel, R.: Melaninbildende Fermente bei *Drosophila melanogaster* I. Biol. Z. **63**, 377 (1943). — Danneel, R., u. B. Zimmermann: Über das Vorkommen und Schicksal des Kynurenins bei verschiedenen *Drosophila*rassen. Z. Naturforsch. 9b 789 (1954). — Egelhaaf, A.: Der Gehalt an freiem Tryptophan und Kynurenin bei den Genotypen $a^-$ und $a$ von *Ephestia kühniella* während der Entwicklung. Z. Naturforsch. **12**b, 465 (1957). — Fischer, F. G., u. H. Dörfel: Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweißhydrolysaten. Biochem. Z. **324**, 544 (1953). — Gloor, H.: Entwicklungsphysiologische Untersuchung an den Gonaden einer Letalrasse *(lgl)* von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **50**, 339 (1943). — Grob, H.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Speicheldrüsen der Letalrasse *lgl* von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **21**, 243 (1946). — Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Speicheldrüsen, dem Darmtraktus und den Imaginalscheiben einer Letalrasse *(lgl)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 320 (1952). — Hadorn, E.: An accelerating effect of normal "ring-glands" on puparium formation in lethal larvae of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **23**, 478 (1937a). — Transplantation of gonads from lethal to normal larve in *Drosophila melanogaster*. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) **36**, 632 (1937b). — Die Degeneration der Imaginalscheiben bei letalen *Drosophila*larven der Mutation *lethal giant*. Rev. suisse Zool. **45**, 425 (1938). — Letalfaktoren. Stuttgart: Georg Thieme 1955. — Pattern of biochemical and developmental pleiotropy. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 363 (1956). — Hadorn, E., u. H. Gloor: Die Auswirkung eines Letalfaktors *(lgl)* bei *Drosophila melanogaster* auf Wachstum und Differenzierung der Gonaden. Rev. suisse Zool. **49**, 228 (1942). — Hadorn, E., and H. K. Mitchell: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 650 (1951). — Hadorn, E., u. J. V. Neel: Der normale Einfluß der Ringdrüse (Corpus allatum) auf die Puppariumbildung bei Fliegen. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-mech. Org. **138**, 281 (1938). — Hadorn, E., u. E. Stumm-Zollinger: Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation "letal-translucida" *(ltr)* von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **60**, 506 (1953). — Karlson, P., u. G. Hanser: Über die Wirkung des Puparisierungshormons bei der Wildform und der Mutante *lgl* von *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **7**b, 80 (1952). — Kikkawa, H.: Mechanism of pigment formation in *Bombyx* and *Drosophila*. Genetics **26**, 587 (1941). — Lehnartz, F.: Einführung in die chemische Physiologie. Berlin: Springer 1952. — Ohnishi, E.: Tyrosinase activity during puparium formation in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Zool. **11**, 69 (1953). — Pryor, M.: Tanning of *Blowfly* puparia. Nature (Lond.) **175**, 600 (1955). — Raper, H. St.: The tyrosinase-tyrosine-reaction. V. Biochem. J. **20**, 735 (1926). — The tyrosinase-tyrosine-reaction. VI. Biochem. J. **21**, 89 (1927). — Richards, A. Glenn: The cuticle of arthropods. Ergebn. Biol. **20**, 1 (1958). — Scharrer, B., and E. Hadorn: The structure of the ring-gland (corpus allatum) in normal and lethal larvae of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci.

(Wash.) **24**, 236 (1938). — Schmid, W.: Analyse der letalen Wirkung des Faktors *lme (letal-meander)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 220 (1949). — Stumm-Zollinger, E.: Vergleichende Analyse der Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe des Wildtyps und der Mutante *„letal-translucida" (ltr)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 126 (1954). — Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin: Springer 1954. — Vogt, M.: Verhalten transplantierter Ringdrüsen „letaler" *Drosophila*-Larven. Z. Naturforsch. **2**b, 292 (1947). — Welch, R. M.: A developmental analysis of the mutant *l (2)gl* of *Drosophila melanogaster* based on cytophotometric determination of nuclear desoxyribonucleic acid (DNA) content. Genetics **42**, 5, 544 (1957). — Wieland, T., and E. Kawerau: Conservation of amino acids chromatograms. Nature (Lond.) **168**, 77 (1951). — Wigglesworth, V. B.: The physiology of insect cuticle. Ann. Rev. Ent. **2**, 37 (1957). — Wunderly, Ch.: Die Papierelektrophorese (Methoden und Ergebnisse). Chimia **7**, 145 (1953). — Wunderly, Ch., u. H. Gloor: Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Protoplasma **42**, 273 (1953).

Dr. Ilse Faulhaber,
Zoologisch-vergl.-anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz)

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 335—346 (1959)

Biology Division, Oak Ridge National Laboratory*, Oak Ridge, Tennessee, USA

# SPONTANEOUS MUTATIONS IN DRY SPORES OF NEUROSPORA CRASSA**

By

Charlotte Auerbach

With 2 Figures in the Text

*(Received July 6, 1959)*

Two main mechanisms of mutation may be imagined. The original gene may be changed by the impact of physical or chemical energy, as when an ionization takes place inside it or very close to it. Alternatively, there may be an error in the process of gene replication, resulting in a mutated daughter gene. Until recently, an experimental distinction between these alternatives seemed possible. The first mechanism was presumed to give rise to a wholly mutated clone of cells, the second to a mosaic. Our present ideas about the duplex nature of the essential genetic material (Watson and Crick 1953) and its mode of replication (Taylor, Woods and Hughes 1957, Meselson and Stahl 1958) throw some doubt on the validity of these inferences. Without at the moment discussing this point, we may yet distinguish operationally between two possible classes of mutation: those that have replaced the original pattern of information by a new one, and those that, while likewise creating a new pattern, have yet left the original one able to form replicas. The first class will give rise to a wholly mutated clone, the second to a mosaic. Whereever the first class is found, it seems reasonable to attribute it to an alteration that affected the original gene as well as its descendants.

There is good evidence that X rays and certain chemical mutagens, e.g., mustard gas, can produce mutations by the first mechanism. Thus treatment of *Drosophila* spermatozoa by one of these agents may yield progeny that displays a visible mutation over the whole of its body. In bacteria, auxotrophic colonies have been produced by X irradiation of dry prototrophic cells (Devi, Pontecorvo and Higginbottom 1951); since auxotrophic nuclei usually behave as recessives, these colonies cannot have been mosaics. For spontaneous mutations, similarly conclusive evidence is lacking. The finding by Novick and Szilard (1950) that the frequency of bacterial mutations in the chemostat rises linearly with time, independent of generation time within a fairly wide range, suggests that there is no close association between division and mutation. On the other hand, mutation frequency decreased when generation time was very long (Lee, quoted by Novick 1955) and might well have dropped to zero on complete cessation of growth. Muller (1946), Lamy (1947), and Byers and Muller (1952) have shown that recessive sex-linked lethals accumulate in *Drosophila* spermatozoa during storage in the ♂ or in the seminal receptacles of the ♀. But since a mosaic $F_1$ ♀ that carries a lethal throughout her gonads cannot be distinguished

* Operated by Union Carbide Corporation for the United States Atomic Energy Commission.

** Work carried out while the author was a Visiting Investigator at Oak Ridge National Laboratory on leave of absence from Edinburgh University.

from a nonmosaic ♀ that is heterozygous for a lethal, these results are ambiguous. As MULLER (1954) has pointed out, they may be interpreted to mean that storage of spermatozoa, perhaps through accumulation of a mutagen, creates a tendency for faulty gene replication at the first cleavage division; a similar stricture applies to experiments in which reverse biochemical mutations have been detected in nondividing bacteria (KAPLAN 1947, RYAN 1955, 1957a, b, MARCOVICH 1958) or fungi (WAINWRIGHT 1956). Unless in these cases replication of the original gene during storage or on the screening medium can be rigorously excluded, the actual mutations may have occurred as errors of replication before or after plating. This interpretation cannot be disproved without laborious tests of each mutant colony for mosaicism. Even if such tests were carried out, a negative result would be inconclusive because of the possibility that an originally present auxotrophic colony sector may have been kept back from further development through adverse selection. RYAN'S latest results (1958) have, in fact, led him to the hypothesis "that gene duplication is necessary for most if not all of the rare mutations which occur in the absence of cell division".

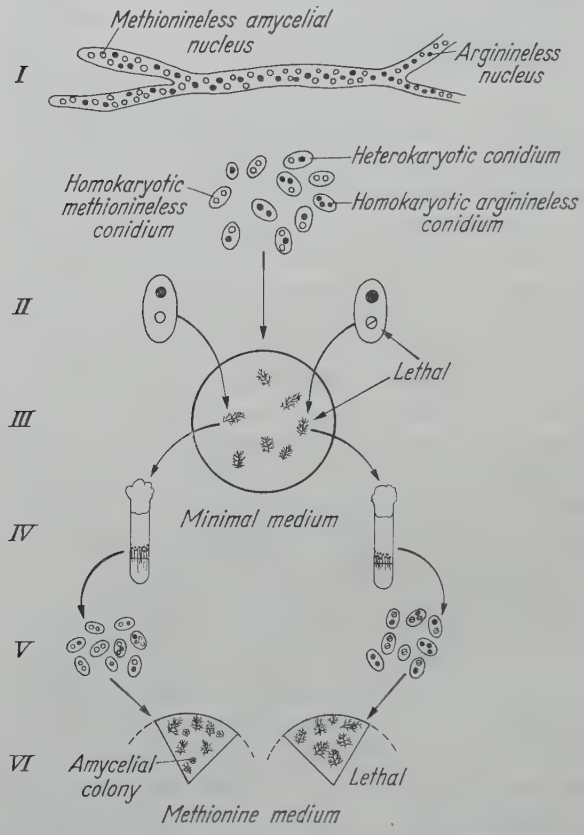



Fig. 1. Diagram of ATWOOD'S method of scoring recessive lethals in a *Neurospora* heterokaryon. *I* Mycelium growing on minimal medium. *II* Conidia formed by the mycelium. *III* Isolation plate; individual heterokaryotic conidia grow into isolated colonies on sorbose minimal medium. One conidium carries a recessive lethal in its methionineless nucleus. *IV* Individual colonies are picked into tubes with solid minimal medium. *V* Each colony has grown into a conidiating isolate. *VI* Isolates growing on sectors of a plate with methionine-supplemented sorbose medium. Amycelial colonies are absent from sectors which contain lethals

In the experiments to be described, a system was chosen that, by automatically excluding mosaics from the score, records only mutations affecting the original gene.

## Material and Methods

Recessive lethals were scored by ATWOOD'S method (ATWOOD 1949, ATWOOD et al. 1958). For proper evaluation of the results, a short description of the method will be useful (see Fig. 1). The strain used, kindly supplied by Dr. ATWOOD, was a single colony isolate from minimal medium of a balanced heterokaryon between argininеless and methionineless. The methionineless nuclei carry, in addition, the gene for amycelial. The strain is grown on minimal medium (I), where it forms three kinds of conidia (II): Homokaryotic methionineless, homokaryotic argininеless, and heterokaryotic. Samples of conidia are plated thinly on minimal

sorbose medium, where only the heterokaryotic ones can grow into colonies (III). These plates will be called "isolation plates". Individual colonies from these plates are transferred to tubes with minimal medium (IV) and allowed to form conidia (V). Subsequently, conidial suspensions from these cultures are squirted separately onto sectors of plates with methionine-supplemented sorbose medium (VI). On this medium, two types of colony can grow out: heterokaryons, and methionineless amycelial homokaryons. The latter are strikingly abnormal in growth habit, forming small compact spheres of large cells. In general, both types are present in any one sector. But if the conidial suspension from one of the tubes contains a lethal in its methionineless component, amycelial colonies are absent. Scoring is easy and can be done rapidly at low magnification. Doubtful sectors are retested by carefully picking a small piece of heterokaryotic mycelium, growing it into a culture on minimal medium and repeating the test. These doubtful cases are of three main types. (1) The original isolate gave rise to a poorly conidiating culture, so that the squirted sample is not large enough to make the absence of amycelial colonies meaningful. If repicks again give poorly conidiating cultures, these cases may remain undecided. They have not been included among scored lethals. (2) There may be one or a few amycelial colonies in an otherwise wholly mycelial sector. These cases are usually caused by contamination from other sectors on the same plate, and will give full lethals on retesting. (3) Amycelial colonies are absent from a sector, but the nongerminated conidia are larger than normal and seem to have made some attempt at amycelial growth. These cases were fairly frequent in the experiments to be described. In each individual series, they were scored separately as "semilethals", but in the final recording of the summarized data they were grouped together with full lethals. This appeared justified on two grounds. First, there is always a very clear distinction between a semilethal and a nonlethal, whereas the distinction between a full lethal and a semilethal is usually difficult and sometimes impossible without more elaborate tests. Second, while the ratio of semilethals to full lethals increased in proportion to the author's familiarity with the scoring technique, the use of over-all frequencies of lethals plus semilethals resulted in highly consistent results throughout the course of the work.

The first plating on unsupplemented isolation plates ensures that only recessive lethals will be submitted to the test, although small degrees of dominance might remain undetected. Care was always taken to pick completely at random from the isolation plates by either fully picking a few plates or, when this was not feasible, by avoiding any bias in favour of large or small colonies. Again, the consistency of the results indicates that this technique was sufficient to exclude unconscious selection for or against lethals with slight phenotypical effect. Moreover, in previous experiments by this technique, ATWOOD (personal communication) had found no correlation between colony size on the isolation plate and presence or absence of a lethal.

Lethals that occur or are present in conidia with more than one methionineless nucleus will go undetected. This results in an unavoidable loss of scorable lethals; but as long as there is no reason to suspect that the proportion of "lost" lethals varies markedly between different series, this is no serious objection to the validity of the method. The possibility that spurious changes in lethal frequency may arise through alterations in nuclear number or proportion will have to be taken into account in the interpretation of the results. For the present purpose, this complication was more than outweighed by the consideration that mutations that arise after plating of the conidia on the isolation plates will be among the "lost" ones; expressed differently, all scorable lethals must have been present in the conidia at the time of collection or must have arisen in them between collection and plating.

A technique suggested by ATWOOD was used for the collection and storing of dry conidia. Glycine powder was dried and sterilized for several weeks at 60° C. Conidia were collected by shaking a profusely conidiating culture vigorously with the dry glycine powder. The mixture was then thoroughly stirred and squeezed with a sterile spatula, and aliquots were distributed into dry flasks, keeping one aliquot for immediate testing. One of the flasks with the glycine-spore mixture was kept at 30° C, the other at 4°. Since the experiment grew out of what originally had been intended as a pilot test, proper control of humidity in the flasks was neglected. This led to a visibly recognizable difference between the two spore samples. At 30°, the glycine-spore mixture remained sufficiently dry to be fluffy and easily dispersed by shaking, with only a thin layer of spores adhering to a few areas of the glass. At 4°, moisture collected inside the flasks, and as time went on, more spores coated the surface and the mixture tended to cake.

Sampling of stored spores was done by removing a small amount of the glycine-spore mixture into a tube with sterile distilled water, where the glycine dissolved, leaving the conidial suspension available for counting and testing. Counting was done by haemocytometer, and survival values were based on comparisons between haemocytometer count and colony formation on the isolation plates. Since only heterokaryotic conidia grow on minimal media, survival can never be 100%. In young healthy cultures it usually varies around 50%. For two reasons, survival values in these experiments are no more than rough approximations. One is the possibility that death during storage may affect conidia of different nuclear types to different degrees; this would result in underestimates or overestimates of total survival rate, according to whether heterokaryotic or homokaryotic conidia are discriminated against. In addition, many conidia in the later series had shrivelled to an extent that made it difficult to recognize them as such. Fortunately, the estimates of mutation frequencies by ATWOOD's method are not based on surviving spores, but on actual numbers of tested ones. The inaccuracy of the viability estimates thus does not affect the accuracy of the genetical results; it must, however, be kept in mind when the data are interpreted.

Table 1. *Series H (spores stored at 30° C)*

| Sample No. | Weeks after start of experiment | Percentage survival (approximate) | No. of spores tested | No. of lethals + semi-lethals | Percentage mutations | 95% Confidence limits |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 100[1] | 385 | 0 | 0 | Upper: 1 |
| I | 5 | 35 | 521 | 8 | 1.5 | 0.7— 3.0 |
| II | 8 | 10 | 538 | 15 | 2.8 | 1.6— 4.6 |
| III | 12 | 10 | 487 | 19 | 3.9 | 2.4— 6.0 |
| IV | 18 | No record | 443 | 25 | 5.6 | 3.7— 8.3 |
| V | 22 | 4 | 436 | 30 | 6.9 | 4.6— 9.6 |
| VI | 27 | 0.5 | 298 | 27 | 9.0 | 6.0—12.9 |

[1] Taken as 100%; the actual value was about 20%.

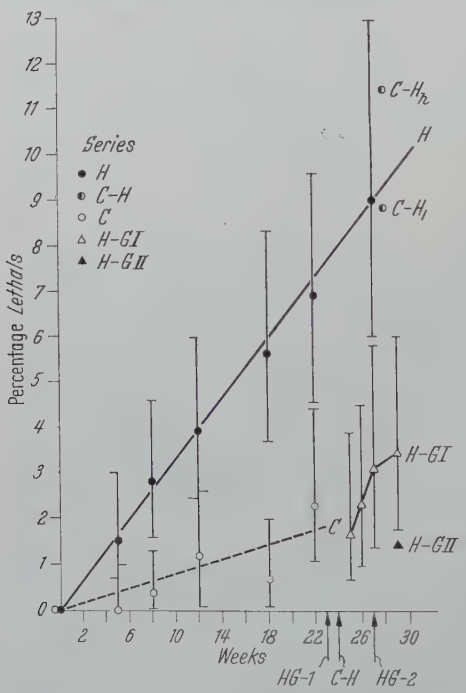



Fig. 2. The frequencies of recessive lethals in *H* conidia stored dry at 30° C, *C* conidia stored dry at 4° C, *C—H* conidia stored dry at 30° C for 24 weeks and subsequently transferred to 4° (*C—H*$_l$ = lower value, *C—H*$_h$ = higher value), *H—G I* and *H—G II* conidial samples from growth tubes that had been started with conidia from the *H*-series at 23 and 27 weeks. Vertical lines = fiducial limits for a probability of 5%

In no sample could signs of growth be detected under the microscope.

## Results

*Series H: Conidia stored at 30° C.* The results of this series are summarized in Table 1 and curve H of Fig. 2. Time intervals are expressed in full weeks from the start of the experiment, although several samples were taken at intermediate dates. Survival is expressed in percentage of the initial value. This was only 20%, probably because the culture was 3 weeks old. The recorded mutations include three doubtful cases lost before retesting, but probably lethals. Two other doubtful cases, which in two transfers gave insufficient conidia for testing, have been excluded.

It will be seen that mutation frequency increased strictly in proportion to time, the increment per week being 0.3%.

When Sample I had yielded eight lethals, in contrast to none in Sample 0, the possibility was considered that the culture of origin had contained a mutated sector, which accidentally had not been represented in the initial sample. If this were so, the eight lethals would be expected to form a clone of identical mutations, and heterokaryons for any two of them should still test as lethals (Atwood 1950, 1953). Accordingly, all 28 possible heterokaryotic pairs were tested for the ability to form amycelial colonies on methionine-supplemented plates. The result showed that six of the eight lethals were not identical. Of the remaining two, one had either reverted or had lost its lethal character through contamination. A second belonged to the curious class of lethals, meanwhile also encountered by Atwood (personal communication), which appear to be noncomplementary with every other lethal.

Table 2. *Series C (spores stored at 4°C)*

| Sample No. | Weeks after start of experiment wk) | Percentage survival (approximate) | No. of spores tested | No. of lethals + semi-lethals | Percentage mutations | 95 % Confidence limits |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 100[1] | 385 | 0 | 0 | Upper: 1 |
| I | 5 | 20 | 513 | 0 | 0 | Upper: 1 |
| II | 8 | 35 | 560 | 2 | 0.4 | 0.04—1.3 |
| III | 12 | 25 | 507 | 6 | 1.2 | 0.4 —2.6 |
| IV | 18 | Norecord | 449 | 3 | 0.7 | 0.1 —2.0 |
| V | 22 | 4 | 389 | 9 | 2.3 | 1.1 —4.4 |

[1] Taken as 100%; the actual value was about 20%.

This result was considered to rule out the pre-existence of a large mutant sector in the original culture. No tests of identity were carried out on lethals from later samples.

*Series C: Spores stored at 4° C.* Samples for Series C were taken simultaneously with those for Series H, and the same initial sample was used as control for both. The last sample (27 weeks) was not taken in this series because the spores were used for a different purpose (Series C—H). The results are presented in Table 2 and Curve C in Fig. 2.

In this series, too, mutations accumulated during storage; but variation is large, and the data are not good enough for mathematical analysis of the trend. Moreover, as pointed out before, moisture content visibly increased during storage, thus introducing a new variable. A straight line has been fitted by hand.

*Series C—H: Spores transferred from 4° to 30°.* This series was carried out in order to test whether prolonged storage at low temperature would destroy the capacity of spores to produce a full quota of mutations at high temperature. The result was unexpected.

Two weeks after Sample V had been taken, i.e., 24 weeks after the start of the experiment, the C-flask with the remaining spores was transferred to 30° C (see point C—H on the abscissa of Fig. 2). After 4 weeks' storage at 30°, the spores were tested for viability and lethal frequency. Viability had dropped to about 0.2% of its value in the original sample of conidia. 342 tested conidia were found to carry a total of 38 lethals, semilethals, and doubtful cases. Unfortunately, the experiment had to be terminated before the doubtful cases could be analysed. Mutation frequency is 11.4% when they are included, and 8.8% when they are excluded. The two values have been entered in Fig. 2 as

points C—$H_h$ and C—$H_l$. It will be seen that the lower point lies very near the level of the corresponding point on the H-curve, while the higher point exceeds this level. Thus, although conidia that were kept constantly at 30° required 19 weeks to increase their lethal frequency from 2.8% in Sample II to 9% in Sample VI, conidia stored at 4° for 24 weeks achieved a comparable increase (from 2.3% to at least 8.8%) in 4 weeks spent at 30°.

*Series HG-1 and HG-2: Mutations in growing cultures.* These series were carried out for two purposes: (1) to test what proportion of the accumulated lethal mutations would be shed when the dried spores were given a chance to form a growing culture and (2) to measure the increase in mutation frequency during subsequent growth at 30° C.

*Series HG-1.* Eight days after collection of Sample V, i.e., approximately 23 weeks after the start of the experiment, a spore sample from the H-flask was introduced into one end of a growth tube with minimal medium (see point HG-1 on the abscissa of Fig. 2). It took a few days for a regular growing frontier to develop, but subsequent growth was fully as fast as is normal for this strain at this temperature. A special kind of growth tube was used that permits the joining of successive tubes without gaps in the medium. By this means Culture HG-1 was kept growing uninterruptedly until the termination of the whole experiment 29 weeks after its beginning. Samples of conidia for testing were taken at the end of the first, second, third, and fifth growth tubes, i.e., 2, 3, 4, and 6 weeks after the first tube had been inoculated. The results are presented in Table 3 and curve HG-1 of Fig. 2.

Table 3. *Mutation frequencies during continued growth of Culture HG-1. This culture had been started with a spore sample from the H-series 23 weeks after the beginning of the experiment*

| Sample No. | Weeks after inoculation of first growth tube | Percentage survival (approximate) | No. of tested conidia | No. of lethals + semi-lethals | Percentage mutations | 95% Confidence limits |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GI | 2 | 30 | 337 | 6 | 1.7 | 0.7—3.9 |
| GII | 3 | 50 | 350 | 8 | 2.3 | 1.0—4.5 |
| GIII | 4 | Not recorded | 288 | 9 | 3.1 | 1.4—5.8 |
| GIV | 6 | 20 | 344 | 12 | 3.5 | 1.8—6.0 |

At the end of the first growth tube, in Sample G-1, the proportion of conidia that were able to form conidia on minimal medium was at least as high as in the original sample with which the whole experiment had been started 23 weeks earlier. In subsequent samples from HG-1 this proportion varied; but it is doubtful whether these variations represent genuine changes in viability. They may well have been caused by sampling errors combined with accidental shifts in the ratio of homo- to heterokaryotic conidia. Concomitantly with the restoration of viability, there was a drastic reduction in the frequency of recessive lethals. Curve H, Fig. 2 shows that at the time Sample G-1 was taken, the dried conidia contained about 7.5 lethals. In Sample G-1, lethal frequency had dropped to 1.7%. Indeed, it is probable that this drop does not express the full reduction in mutation frequency during establishment of the growing frontier; for it may be assumed that the accumulation of new lethals, which could be shown to take place in subsequent tubes, had started simultaneously with the beginning of

active growth. Extrapolation of Curve HG-1 to the beginning of week 24, when Culture HG-1 had started to grow normally, gives a lethal frequency between 1 and 1.5%. Thus 80% or more of the accumulated lethals had been lost during the initial stages of growth. During the third and fourth weeks of growth, new lethals accumulated at a rate of 0.6—0.7% per week. A third sample, taken after 6 weeks, yielded a point below the straight line drawn through the first three, but the error margins are too wide to make this deviation significant. The data are compatible with the assumption that accumulation rate was proportional with time.

*Series HG-2.* Since it seemed possible that selection in HG-1 had operated against conidia that, because of some dominant effect of the lethal, had been slow to germinate, a second growth tube was started by a technique suggested by Dr. F. J. DE SERRES. Twenty-nine weeks after the start of the experiment, when the last sample for Series H was taken, the remaining spores were suspended in water and centrifuged down into a pellet, which then was placed on a plate with minimal sorbose medium. This was meant to give all conidia a good chance of participating in the formation of the mixed heterokaryon. Four days later, when the pellet had grown into a dense colony, a growth tube was inoculated with a small piece from the centre of this colony. A growing frontier was established without the delay noticed in HG-1, but subsequent growth rate was only two-thirds of normal. This was tentatively attributed to a dominant effect of the lethal nuclei on growth rate, comparable to the retarding effect of many *Drosophila* detrimentals on development (DOBZHANSKY, HOLZ, and SPASSKY 1942, BONNIER and JONSSON 1957). It seemed to indicate that the pellet technique had been successful in forcing many lethal nuclei into the mixed heterokaryon. When, however, mutation frequency was tested at the end of the growth tube, 326 conidia, with a survival of about 40%, were found to contain only three lethals, one semilethal, and one doubtful case. Mutation frequency was 1.2 or 1.5%, according to whether the doubtful case is excluded or included, compared with 9% in the initial inoculum. Thus, as in HG-1, at least 80% of the lethals had been eliminated.

## Discussion

Inherent in the heterokaryon method for the determination of mutation frequencies is one unavoidable source of error; lethals in conidia with more than one methionineless nucleus will remain undetected, so that changes in the average number of nuclei per conidium may simulate changes in mutation frequency. In the present case it might be thought that the increase in mutation frequency during dry storing was caused, not by the occurrence of new lethals, but by the uncovering of "submerged" lethals through a reduction in nuclear number. For various reasons, it seems safe to rule out this possibility.

Suppose that the 9% lethals in Sample VI of Series H had, in fact, been present already in the original culture. For such a proportion of lethals to remain submerged in almost 400 conidia of Sample 0, the vast majority of these conidia must have contained two or more methionineless nuclei. Average nuclear number in Sample 0 must then have been either near four, with approximately equal proportions of methionineless and argininelessness nuclei, or near three, with a very

marked preponderance of methionineless nuclei. Neither alternative finds support in data published by ATWOOD (1955) on the same strain; but the possibility of an unusual number or proportion of nuclei in the tested culture cannot be quite excluded. More convincing is the fact that, of the six lethals in Sample I that could be tested for homology, all turned out to be different. This rules out the presence of one large mutated sector in the original culture. The presence in it of at least six such sectors is very unlikely, especially in view of the results of Series HG-1 and HG-2, which showed that during the establishment of a new culture there is strong selection against spontaneously accumulated lethals. Moreover, if the observed increases in lethal frequencies in Series C and H were caused by the uncovering of submerged lethals through nuclear killing, one would expect some degree of parallelism with survival rates, since only conidia with at least one nucleus of each type can survive on minimal medium. No such parallelism was found. Thus Sample V had about 5% survival in both series, but three times as many mutations in Series H. Again, survival during the first 5 weeks dropped at least as drastically in Series C as in Series H, but only in H was this drop in survival accompanied by an increase in lethal frequency. It may be objected that the mechanism of killing was different in the two series, although the similarity of the survival curves rather suggests that it was similar. But even when Series H alone is considered, there is no indication of a parallelism between the irregular survival curve and the perfectly regular increase in the frequency of lethals. Finally, a reduction in nuclear number during aging of the conidia should lead to a decrease in the proportion of heterokaryotic colonies. This was not examined in the present case; but ATWOOD (personal communication) collected many data on this point and found that a marked reduction in survival of aged conidia was accompanied by no significant change in the heterokaryotic fraction.

It thus appears reasonable to conclude that new lethals arose in the course of the experiment. At $30^0$ C, they accumulated in strictly linear proportion with time. They may have done so also at $4^0$; but the data, although not contradicting this assumption, are too erratic to prove it. For reasons explained before, all these mutations must have affected the original gene as well as its replicas. This indicates that they occurred during dry storing. Alternatively, they might have arisen on the plates during the short interval between plating and the first replication; in this case, the linear relation with time would be attributable to the continued formation of a mutagen that was able to exercise its full effect immediately upon plating. The formation of a mutagen might conceivably be connected with the presence of glycine in the environment, for according to SCOTT (1958) all kinds of interaction take place between dry bacteria and organic chemicals in the storing medium. Since, however, in his experiments the storing medium was present during the drying process, whereas in the *Neurospora* experiment dry conidia were mixed with independently dried glycine, the conditions here seem less favourable to chemical interaction. This is especially true for the $30^0$ series, in which the glycine-spore mixture remained dry and powdery throughout the course of the experiment. For the cold series, in which moisture content increased during storage, the idea of chemical interaction with the outside medium is a possibility to be considered and tested.

Ryan (1958) found that the frequency at which nondividing histidineless bacteria revert to histidine independence depends on rate and type of metabolism in the stationary phase. As far as turnover metabolism alone is concerned, this might be true also for *Neurospora* spores; but the regularity with which lethals kept on accumulating, in spite of progressive desiccation and inviability of the spores, makes it difficult to believe that under these conditions there was a marked correlation between mutation rate and metabolic processes. If Ryan's interpretation of his latest results is correct, such a difference between bacteria and *Neurospora* is only to be expected; for, in contrast to the results presented here for *Neurospora*, mutations in nondividing bacteria require gene duplication and may be errors of replication. On this interpretation, it is not surprising that the rate at which mutations accumulate in dry *Neurospora* spores appears to be lower than that obtained for reverse mutations in nondividing bacteria. Ryan (1955) and Marcovich (1958) found that at 37° C reversions to histidine independence occurred at a rate of $10^{-9}$ per hour per cell. Since these cells contained an average of four nuclei (Ryan and Wainwright 1954), mutation frequency per locus was $0.25 \times 10^{-9}$. Forward mutations at the histidine locus are about 100 times as frequent as reverse mutations (Lieb 1951) and in nondividing bacteria would be expected to arise at a rate of $0.25 \times 10^{-7}$ per hour per cell. If, for the whole *Neurospora* genome, one assumes $10^4$ loci capable of forward mutation at a similar average rate, the expected over-all forward mutation frequency would be $40 \times 10^{-3}$ per week. Since recessive lethals scored in heterokaryons may include much larger deficiencies than forward mutatiosn scored in the ordinary way, they should arise at an even higher frequency. The actual value, $3 \times 10^{-3}$ per week, falls considerably short of this expectation.

Although mutation frequency in Series C was much lower than in Series H, some mutations occurred also at 4°. This is in contrast to findings by Marcovich (1958) and Ryan (personal communication), who failed to obtain histidine reversions when bacteria were stored in the cold. Whether the difference is one of temperature (4° C versus 2° or 0°), type of mutational process (change in original gene versus error of replication), or type of effect (deficiency versus gene mutation), cannot be decided on the present evidence. The occurrence of mutations at low temperatures will make it possible to determine the temperature coefficient for mutations in dry conidia. A very surprising result was the speed with which, in Series C—H, spores that had spent 24 weeks at 4°, reached the mutational level of conidia which had been stored at 30° throughout. If this observation can be confirmed it would seem to indicate that under the conditions of these experiments the mutational process consists of several steps, the final one of which has a high temperature coefficient.

When, after several months of storage at 30° C, growth was renewed, 80% or more of the lethals were lost during establishment of the growing frontier. Atwood and Pittenger (1955) found the same when growth tubes were inoculated with X-rayed conidia, but in their case the loss of lethals was considerably smaller. This does not necessarily point to a difference in the selective disadvantages of lethals occurring under these two sets of conditions. Various other factors may have contributed to the discrepancy or may, between them, fully account for it. One is the difference in age between the cultures used for these experiments.

ATWOOD and PITTENGER worked with conidia from young cultures, but the present experiment was started with a 3-week-old culture. Its conidia no longer had their full viability and may have had less than the average nuclear number. Restoration of full nuclear number during renewed growth after storing may have driven a proportion of the lethals underground. If this were so, repetition of the experiment with a young culture should result in a lower level of mutations throughout storage. In addition, the dry spores with which tubes HG-1 and HG-2 were inoculated were in very poor condition; the majority were dead, and many of the survivors were slow to germinate and form colonies. For the lethal tests, small and large colonies were picked impartially from the isolation plates; but in the growth tubes, selection for speed of germination and growth must have been strong. Experiment HG-2 showed that forcing more of the slow growers into the mycelium did not rescue a higher proportion of lethals; obviously there was no markedly dominant effect of the lethals on growth rate. This need not, however, be true for germination delay, and the technique used in HG-2 (initial pellet formation on sorbose medium) may not have abolished discrimination against slowly germinating spores. Moreover, the sorbose medium, by shifting nuclear proportions in favour of amycelial (ATWOOD 1955), may have camouflaged a proportion of lethals. Finally, when growth is initiated by a small fraction of conidia, chance alone will tend to exclude the minority type, i.e., the lethal-bearing ones.

It is probable that selection against a certain type of lethal will continue during growth, although it may do so less stringently than in the initial stages of a culture. This may in part explain why mutation rate in the growth tubes was hardly twice that of conidia stored dry at the same temperature, whereas bacterial mutations to histidine independence occurred about 40 times as frequently during growth as in the stationary phase (RYAN 1955). The conditions of growth, however, are different in a liquid bacterial culture, and a *Neurospora* growth tube, and an attempt to analyse the causes of this discrepancy would hardly be fruitful. Much more important is the observation that for at least two weeks new lethals kept on accumulating at a constant rate during growth. This indicates that, if selection was indeed operative during this period, it removed a constant proportion of all newly arising lethals and did not act on already established ones. This conclusion had already been drawn by ATWOOD and PITTENGER (1955) from data obtained by irradiating cultures in growth tubes. They found that there is no selection in growth tubes against X-ray-induced lethals that have survived the initial competition, and that repeated irradiation of a growing culture yields the compounding of lethals that is to be expected if the above inferences are correct. The significance of these observations is that they open the way to a quantitative study of factors that influence mutation rate in a growing culture.

The bearing of the present results on our ideas about the nature of the genetic material remains to be mentioned. The Watson-Crick model of chromosomal DNA would lead us to expect that most mutations arise first as mosaics. Exceptional nonmosaics after X irradiation can be explained as breakage of both strands of the double helix by the same ion cluster. The milder, thermal or chemical stimuli that result in spontaneous mutation are more likely to affect only one of the two strands. Without further evidence it is not possible to decide

whether the conditions under which recessive lethals arise in dry *Neurospora* conidia are exceptional, or whether our speculations on the nature of spontaneous mutation will have to consider mechanisms for affecting a whole cross section of the double DNA helix.

## Summary

Atwood's method was used for scoring recessive lethals in a *Neurospora* heterokaryon with an amycelial component. Conidia were stored dry at 30° and 4° C, and samples were tested for lethals every few weeks over a period of 7 months. At 30°, lethals accumulated in strictly linear proportion with time, at a rate of 0.3% lethals per week. At 4°, the rate of accumulation was much slower; the data are not sufficient to decide whether it was linear. When conidia that had spent 24 weeks at 4° were transferred to 30°, the proportion of lethals increased steeply to the level that had meanwhile been reached in the warm series. This points to the possibility of resolving the mutational process into successive steps with different temperature coefficients. Reasons are given for presuming that none of the lethals had been present in the culture of origin and for excluding their occurrence through errors of gene replication during storage or on the plates.

When samples of conidia from the warm series were inserted into growth tubes, 80% or more of the accumulated lethals were lost during the initial stages of growth. Subsequently, lethals accumulated again at a rate that remained constant for at least 2 weeks. This, together with similar observations by Atwood and Pittenger (1955), opens the possibility of studying mutation rates during growth in growth tubes.

**Acknowledgments.** Grateful acknowledgment is due to the United States Atomic Energy Commission and to Dr. Alexander Hollaender for the generous provision of working facilities. It is a pleasure to record my gratitude to Dr. K. C. Atwood for introducing me to the methods used in this investigation and for many stimulating discussions. I also want to thank my colleagues in Oak Ridge for their helpful interest in the work, and Mrs. Arlee Teasley for competent and devoted technical assistance.

## Literature

Atwood, K. C.: Detection of physiological mutants in *Neurospora* without the use of selective media. Biol. Bull. **97**, 254—255 (1949). — The homology patterns of induced lethal mutations in *Neurospora crassa*. Biol. Bull. **99**, 332 (1950). — Nuclear distribution in conidia of *Neurospora* heterokaryons. Genetics **40**, 438—443 (1955). — Atwood, K. C., and F. Mukai: Indispensable gene functions in *Neurospora*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 1027—1035 (1953). — Atwood, K. C., F. Mukai and T. H. Pittenger: "Punch tube" and "squirting" methods for *Neurospora*. Microbiol. Genet. Bull. **16**, 34—35 (1958). — Atwood, K. C., and T. Pittenger: X-ray-induced mutations in growing mycelium of *Neurospora*. Radiat. Res. **3**, 212 (1955). — Bonnier, G., and U. B. Jonsson: Rate of development of viability mutants in *Drosophila melanogaster*. Evolution **11**, 271—279 (1957). — Byers, H. L., and H. J. Muller: Influence of ageing at two different temperatures on the spontaneous mutation rate in mature spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. Genetics **37**, 570—571 (1952). — Devi, P., G. Pontecorvo and C. H. Higginbottom: Mutations affecting the nutritional requirements of *Aerobacter aerogenes* induced by irradiation of dried cells. J. gen. Microbiol. **5**, 781—787 (1951). — Dobzhansky, Th., A. M. Holz and B. Spassky: Genetics of natural populations. VIII. Concealed variability in the second and fourth chromosomes of *Drosophila pseudo-obscura* and its bearing on the problem of heterosis. Genetics **27**, 463—490 (1942). — Kaplan, R. W.: Spontane Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum*. Z. Naturforsch. **2b**, 308—312 (1947). — Lamy, R.: Observed spontaneous mutation rates in relation to experimental technique. J. Genet. **48**, 223—236 (1947). — Lieb, M.: Forward and reverse

mutation in a histidine requiring strain of *Escherichia coli*. Genetics **36**, 460—477 (1951). — Marcovich, H.: Recherches sur la mutabilité spontanée d'*Escherichia coli* B. Proc. X. Int. Congr. Genet. **2**, 179—180 (1958). — Meselson, M., and F. W. Stahl: The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 671—682 (1958). — Muller, H. J.: Physiological effects on "spontaneous" mutation rate in *Drosophila*. Genetics **31**, 225 (1946). — The nature of the genetic effects produced by radiation. In: Radiation Biology, vol. I, pp. 351—473 (ed. A. Hollaender). New York: McGraw-Hill Book Comp. 1954. — Novick, A.: Mutagens and antimutagens. Brookhaven Symp. Biol. 8, 201—216 (1955). — Novick, A., and L. Szilard: Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **36**, 708—719 (1950). — Ryan, F. J.: Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. Genetics **40**, 726—738 (1955). — Mutation in non-dividing bacteria. Cytologia (Tokyo), Suppl., 555—558 (1957a). — Natural mutation in non-dividing bacteria. Trans. N.Y. Acad. Sci. **19**, 515—517 (1957b). — Mutation as an error in gene duplication. Proc. X. Int. Congr. Genet. **2**, 246 (1958). — Ryan, F. J., and L. K. Wainwright: Nuclear segregation and the growth of clones of spontaneous mutants of bacteria. J. gen. Microbiol. **11**, 364—379 (1954). — Scott, W. J.: Some interactions between factors affecting the viability of dried micro-organisms. J. gen. Microbiol. **19**, II—III (1958). — Taylor, H., P. S. Woods and W. L. Hughes: The organisation and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 122—128 (1957). — Wainwright, L. K.: Spontaneous mutation in stored spores of a streptomyces species. J. gen. Microbiol. **14**, 533—544 (1956). — Watson, J. D., and F. H. C. Crick: Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid. Nature (Lond.) **171**, 964—966 (1953).

Dr. Charlotte Auerbach, Institute of Animal Genetics
West Mains Road, Edinburgh 9, Scotland

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 347—355 (1959)

# GENETIC INTERACTION OBSERVED IN BACILLUS SUBTILIS

By

Masamichi Kohiyama

With 5 Figures in the Text

*(Received June 26, 1959)*

Although genetic recombination has been extensively studied in the *Enterobacteria*, no publication has dealt with genetic interaction between two cells of spore-bearing bacteria. In this paper, a new type of genetic interaction found in *Bacillus subtilis* will be described.

When two doubly auxotrophic mutants were inoculated in mixture onto appropriate media, there were produced not only what appeared to be recombinants but also some anomalous progeny with new genetic characters not recognized in either parents. It seems to me that this phenomenon is more like that found in *Streptomyces coelicolor* than in *Escherichia coli* (Bradley 1958).

## Materials and Methods

*Strains.* Biochemical mutants were derived from a wild strain of *Bacillus subtilis K* by exposing a spore suspension to X-rays: this procedure was followed by the penicillin screening method of Lederberg (1950). Streptomycin-resistant mutants were obtained by Szybalski's agar-gradient method (Szybalski 1952). The morphological mutants used are of spontaneous origin. The mutants used throughout these studies were as follows:

T 12: A tryptophane-, thiamine-dependent and streptomycin-sensitive mutants. Flat type (Fig. 1).

M 12: A methionine-, histidine-dependent and streptomycin-sensitive mutants. Umblicate type (Fig. 1).

M 13: A streptomycin-resistant mutant derived from M 12.

T 16: A tryptohane-, adenine-dependent and streptomycin-resistant mutant. Mucoid type (Fig. 2).

*Media.* Gray and Tatum's synthetic medium was employed as minimal medium, and nutrient broth, supplemented with 0.1% of yeast extract, as complete medium. When necessary, these media were solidified with 1.8—2.0% of purified agar. For special purposes Gray and Tatum's medium was modified by the addition of nutrients. Regarding the composition of these supplemented media, see the footnote of Table 1.

*Method of Crossing.* Two mutants were cultivated separately at 30° C in nutrient broth in shaken tubes. Cells of the late logarithmic phase were centrifuged and washed once with 0.1 M phosphate buffer ($p_H$ 7.3). Cell suspensions prepared from the two mutants were mixed and plated on minimal medium, complete medium and media supplemented with various combinations of nutrients. As a control, the cells were plated on the same media without mixing. The number of viable cells in the suspension was determined by spreading aliquots on nutrient agar after dilution. All platings were carried out in triplicate.

*Analysis of tiny colonies.* The tiny colonies resulting from the mixed inoculation of two mutants were analysed in the following way: a complete tiny colony was carefully picked up and homogenized in a small mortor. As a result, more than 95% of the cells suspended in 1.0 ml phosphate buffer were separated from their siblings and were single. Platings, after appropriate dilution, were made onto nutrient agar medium as well as onto media which allowed selective growth of the component types. The plates, always prepared in duplicate, were incubated at 37° C for two or three days. The genetic traits of the resulting colonies were determined in the following ways.

For example, in the case of Colony No. 5 in the Table 5, as the colony morphologies of M 13 and T 12 were different, the frequency of cells was determined by classifying the colonies on nutrient agar according to their colony type. This counting method was verified by replicating the above colonies onto MHS and TB media. The colonies resulting from plating

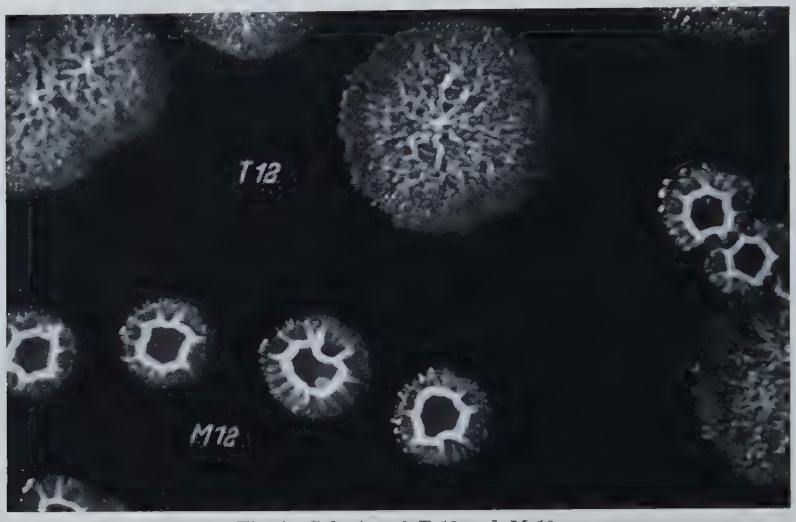



Fig. 1. Colonies of *T 12* and *M 12*

Fig. 2. Colonies of *T 16*

on TBS medium were replicated onto TS, BS and TBS, which allowed separation into *try, thi, str-r* and *try, str-r*. The number of *try, thi, str-r* cells was determined by counting the colonies on TBS medium, from which the *try, str-r* colonies were subtracted; the number of *try, str-r* cells was found simply by counting the colonies on TS media which were proven not to be prototrophs by the replica plating method (LEDERBERG 1952).

## Results

### *1. Occurrence of Tiny Colonies*

When washed cell suspensions of T 16 *(try, ade, str-r)* and M 12 *(met, his, str-s)* were plated together on TH medium (see the footnote of Table 1), confluent

growth of the parental cells was observed after two days, but, except for some simple factor back mutants mainly from M 12, no growth appeared on the control plates where each mutant was inoculated independently. When the two cell suspensions were plated on THS medium which contains 100 $\gamma$ of streptomycin per milliliter, clear and hard tiny colonies (Fig. 3) were obtained with a frequency of ca. $10^{-7}$ (Table 1). No increase of the frequency of tiny colonies was achieved when the two mutant strains were allowed to grow together in nutrient broth before they were plated on THS medium. However, the frequency of tiny colonies varied from one experiment to another, as a function of the age of the mutant cultures or for other unidentified reasons. The tiny colonies found on MHS medium were distinguishable from spontaneously occurring streptomycin-resistant mutants of M 12 which appeared after two days with a frequency of ca. $10^{-8}$.

Table 1. *The frequencies of tiny colonies resulting from crosses*

| | No. of cells plated | No. of tiny colonies appearing on | | |
|---|---|---|---|---|
| | | THS | MHS | TBS |
| | T 16 × M 12 | | | |
| Exp. 1 | $1.1 \times 10^8$ $3.2 \times 10^7$ | 79 | 16 | — |
| Exp. 2 | $1.9 \times 10^8$ $7.8 \times 10^7$ | 178 | 79 | — |
| | T 12 × M 13 | | | |
| Exp. 3 | $1.7 \times 10^8$ $1.1 \times 10^8$ | 85 | — | — |
| Exp. 4 | $2.5 \times 10^8$ $1.7 \times 10^8$ | 60 | — | 48 |

THS: GRAY and TATUM's medium containing tryptophane 50 $\gamma$/ml, histidine 50 $\gamma$/ml and streptomycin 100 $\gamma$/ml. MHS: GRAY and TATUM's medium containing methionine 50 $\gamma$/ml, histidine and streptomycin. TBS: GRAY and TATUM's medium containing tryptophane, thiamine 10 $\gamma$/l and streptomycin.

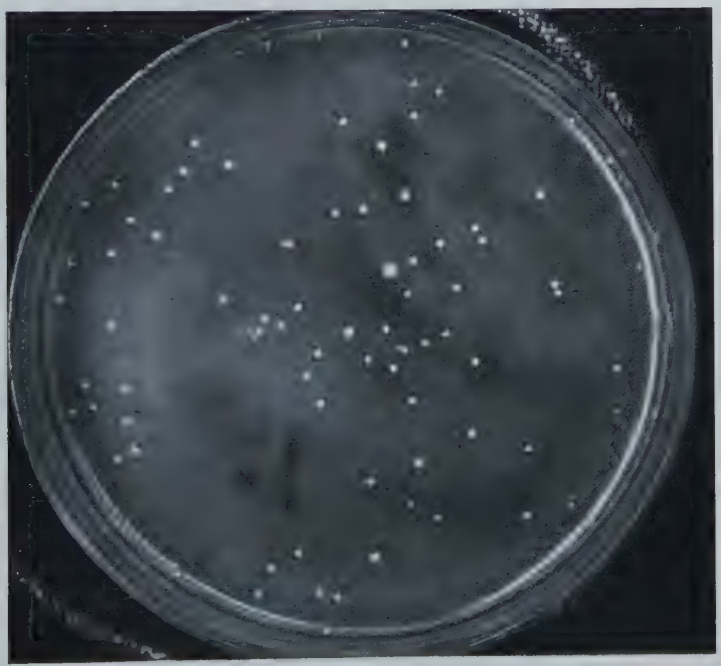


Fig. 3. Tiny colonies on THS medium from the cross *T 16 × M 12*

These tiny colonies were also found on TMS, AMS and AHS media. However those occurring on AMS and AHS media were of uncertain origin, because of the syntrophic effect of coexisting back mutants which formed large colonies on these media.

No colonies were found on minimal medium even after a week; moreover, the tiny colonies mentioned above hardly ever gave rise to prototrophic progeny. This is one of the abnormalities observed in *B. subtilis* which will be discussed later.

Likewise, the mix plating of T 12 *(try, thi, str-s)* and M 13 *(met, his, str-r)* yielded tiny colonies on THS, TMS, HBS, MBS and TBS media in about the same frequencies (Table 1). The colonies on THS medium especially were examined, because they were somewhat larger (2—3 mm in diameter). In this cross, some indistinct tiny colonies appeared with a frequency of approximately $10^{-6}$ on minimal medium, whereas none were found on minimal medium with 100 $\gamma$ of streptomycin per milliliter. Because of technical difficulties, further examination of these colonies was abandoned. As in the cross of T 16 and M 12, the frequency of tiny colonies varied from experiment to experiment.

### *2. Analysis of Tiny Colonies*

**a) Tiny colonies from the cross between T 16 and M 12.** Twenty tiny colonies obtained from four independent crosses and grown on THS medium were analysed. It was found that the most frequent type of cell in the tiny colonies was *try, str-r* (Table 2). Two colonies among them contained mucoid and streptomycin-resistant prototrophic cells in a low frequency. It may well be thought that

Table 2. *Analysis of tiny colonies from a cross of T 16 × M 12*

| Tiny colonies from | Colony No. | No. of cells contained in a tiny colony | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $t^-a^-s^r$ | $t^-s^r$ | $m^-h^-s^s$ | $m^-h^-s^r$ | $s^r$ | unstable colonies on MHS |
| THS | 1 | $< 10^5$ | $43 \times 10^5$ | (1) | 0 | (1) | 0 |
| | 2 | $< 10^5$ | $121 \times 10^5$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MHS | 3 | $163 \times 10^3$ | $131 \times 10^1$ | $369 \times 10^3$ | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | $335 \times 10^3$ | $133 \times 10^1$ | 0 | 0 | 0 | $153 \times 10^1$ |

$t^-$: tryptophane-requiring, $a^-$: adenine-requiring, $m^-$: methionine-requiring, $h^-$: histidine-requiring, $s^r$: streptomycin-resistant. (1) Colonies appearing on MH medium: 0, 2 (prototroph and $m^-h^-s^s$). 0 does not necessarily indicate complete absence.

these tiny colonies on THS medium were the back mutants of T 16 *(try, ade, str-r)*, for the back mutant frequency at the adenine locus ($10^{-9}$—$10^{-8}$) is not very different from the frequency of tiny colonies appearing on THS medium ($10^{-7}$). But the tiny colonies on MHS medium (Colony No. 3) segregated out *try, str-r* progeny in addition to the parental types. This fact leaves open the possibility that the *try, str-r* cells obtained from tiny colonies even on the THS medium were produced by some genetic interaction of two parental cells, for T 16 and its derivative had little selective advantage on MHS medium.

The following two interesting types of progeny were obtained from tiny colonies on MHS medium: one was *met, his, str-s* formed mucoid instead of rough colonies (Colony No. 3): the other is represented by the colonies appearing on MHS medium (Colony No. 4). The latter grew on MH medium only in the presence of streptomycin. At the same time, they were able to grow on TA medium, as is shown in Table 3. However, the character of cells subcultured on TA or nutrient agar was different from that of cells on MHS medium in the following ways: first, they could no longer grow on MHS medium and second, their colony morphology was mucoid while that of the original colonies was rough. Therefore, these anomalous progeny had two potentialities; they could either segregate *try, ade, str-r* cells, or they could form unstable colonies on MHS medium *(met, his, str-d*, as a phenotype). If the anomalous progeny have almost all the genetic material of both parents in one cell, as may be assumed from these results, they may well segregate out some recombinants. As a matter of fact, they formed *try, str-r* colonies on TA medium as well as on TS medium, after they had been subcultured on MHS medium more than three times (Table 4).

Table 3. *Characterization of unstable colonies found on MHS after crossing T 16 × M 12*

| Media | TA | MH | MHS | MS | HS |
|---|---|---|---|---|---|
| Unstable colonies | + | − | + | − | − |
| Unstable colonies subcultured on nutrient agar | + | − | − | − | − |
| Unstable colonies subcultured on MHS | + | − | + | − | − |

In each case, more than four colonies were tested; + represents growth.

No prototrophs were detected throughout the analysis of anomalous progeny.

Table 4. *Analysis of unstable colonies*

| Unstable colonies from | Colony No. | No. of cells contained in a unstable colony | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $t^-a^-s^r$ | $t^-s^r$ | $m^-h^-s^r$ | unstable colonies on MHS |
| MHS | I | $4 \times 10^3$ | 0 | (1) | $45 \times 10^1$ |
| MHS | II | $34 \times 10^3$ | 0 | $2 \times 10^1$ | $26 \times 10^1$ |
| (I) Colony subcultured on MHS | III | $< 10^3$ | $50 \times 10^3$ | (2) | $2 \times 10^3$ |

Analytical method was the same as in the case of tiny colonies.
(1): Colonies appearing on MH medium; 1, 0.
(2): Colonies appearing on MH medium; 3, 0.

**b) Tiny colonies from the cross between T 12 and M 13.** While in the tiny colonies on THS medium of the previous cross both parental strains were not detected at the same time, in the cross between T 12 *(try, thi, str-s)* and M 13 *(met, his, str-r)*, tiny colonies on THS medium contained both parental types in nearly equal frequency (Table 5). Besides the parental cells, the colonies included *try, str-r* progeny in a low frequency. These *try, str-r* cells seemed to be produced by a genetic interaction between two nuclei, for they were equipped with two

genetic characters from M 13, *str-r* and *THI*, and *try* and *MET* from T 12. The following reasoning supported this idea: first, if the *try*, *str-r* progeny arose by the sequential occurrence of spontaneous mutations, the frequency of *try*, *str-r* cells should be proportional to that of the *try*, *thi*, *str-r* cells. Nevertheless,

Table 5. *Analysis of tiny colonies from a cross of T12 × M13*

| Tiny colonies from | Colony No. | No. of cells contained in a tiny colony | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $t^-b^-s^r$ | $t^-s^r$ | $t^-b^-s^s$ | $m^-h^-s^r$ |
| THS | 5 | $55 \times 10^1$ | $19 \times 10^1$ | $56 \times 10^5$ | $40 \times 10^5$ |
| | 6 | 0 | $40 \times 10^1$ | $158 \times 10^3$ | $60 \times 10^5$ |
| | 7 | $72 \times 10^1$ | $5 \times 10^1$ | $171 \times 10^3$ | $610 \times 10^3$ |
| | 8 | $16 \times 10^3$ | 0 | $50 \times 10^5$ | $44 \times 10^5$ |
| TBS | 9 | 0 | $5 \times 10^1$ | $16 \times 10^5$ | $25 \times 10^5$ |

one tiny colony (Colony No. 8) yielded a fair amount of the latter without producing the former; second, all *try*, *str-r* cells formed mucoid colonies on nutrient agar, while the colonies of T 12 were rough (Fig. 4). In this cross, no *thi*, *str-r* progeny were found.

Fig. 4. Mucoid colonies of *try*, *str-r*, from the cross *T 12 × M 13*

### *3. Anomalous Progeny*

When five tiny colonies on THS medium from the cross between T 16 and M 12 were analysed after subculture on the same medium, anomalous progeny, i.e., a strain which was *met*, *his*, *ura*, *str-r*, were obtained from all the tiny colonies tested. In a repetition of this experiment, similar anomalous progeny were detected in two tiny colonies out of the four tested. Nevertheless, two other independent crosses did not produce this type. The appearance of *met*, *his*, *ura*, *str-r* progeny was of particular interest, because the requirement of uracil for growth is a new character which was not recognized in either parent. The new deficient character and the new colonial morphology (mucoid) might have been induced through a similar mechanism.

## Discussion

The phenomenon which was evoked by the contact of two different mutant cells of *B. subtilis K* resembles that observed in *Streptomyces* rather than that occurring in *E. coli*. It is questionable, therefore, whether this phenomenon is caused by a mechanism such as that taking place during genetic recombination in *E. coli* (TATUM and LEDERBERG 1947) where a part of the chromosome from the donor cell is transferred to the recipient at mating so as to produce recombinants (WOLLMAN et al. 1956). This idea *may* be adopted as one possible mechanism by which the *try, str-r* type appears in the T 12×M 13 cross, for it is inexplicable by simple sequential spontaneous mutation. But since this type acquired at the same time a non-parental colony morphology, we must consider an alternative in which some characters (not only mucoid but also *THI* and *str-r*) are induced by a process similar to "Heterocaryotic mutagenesis" (RAPER 1954). As yet, it is difficult to decide which of the alternatives is more plausible, but it may well be that some genetic interaction between two nuclei of mutant cells causes the formation of non-parental progeny. This genetic interaction may also be operative in the appearance of the *try, str-r* progeny from the T 16×M 12 cross. Although the difference between the frequencies of spontaneous *try, str-r* and of the tiny colonies on THS medium which included many *try, str-r* cells was not significant, the following facts suggest that these progeny did not arise by spontaneous mutation. First, the considerable number of *try, str-r* cells in the tiny colonies on MHS medium had little selective advantage; second, methionine-, histidine- and streptomycin-dependent cells, which seemed to have most of both parental chromosomes, became *try, str-r* irreversibly upon serial transfer on MHS medium.

As a step preceding the genetic interaction of nuclei, fusion of two mutant cells which results in the formation of heterocaryons or heterozygotes may be required. This heterocaryon or heterozygote may be the initiator of tiny colonies, whose segregational patterns in non-selective conditions is seen in the analysis of data on tiny colonies from MHS medium in the cross of T 16×M 12 and from THS medium in the cross of T 12×M13. But on THS medium in the cross of T 16×M 12, *try, str-r* segregants, having a selective advantage, dominate the tiny colonies. Since this is the case, some unknown mechanism must operate to prevent the colony from growing larger than it does.

The following considerations may provide an explanation for the paradox in which an entity having two different sets of chromosomes or nuclei still requires some nutrients to grow and be detected. According to classical genetics, heterocaryons or heterozygous diploids are prototrophic, so that the methionine-, histidine-, and streptomycin-dependent progeny should have been prototrophic, for they segregated both *met, his, str-r* and *try, ade, str-r* cells. The tiny colonies too, should have been prototrophic for they contain both parental cells. As already pointed out, the results of genetic studies of *B. subtilis* are quite similar to those made with *Streptomyces coelicolor* in the following respects: first, some new characters which are not recognized in either parent appear among the progeny (BRADLEY 1958); second, "anomalous heterocaryons", which seem to be rather "anomalous heterozygotes", are obtained. The so-called anomalous heterocaryons are particularly interesting because they exhibit some parental

nutritional deficiencies although they contain both parental nuclei, which were complimentary in genotype. These abnormal heterozygotes in *Streptomyces*, as in *B. subtilis* are in a condition where the nutritional deficiencies which are generally thought to be recessive, are dominant. LEDERBERG reported that in *E. coli* an $F^-$ excojugant which had received a chromosomal fragment from Hfr was still phenotypically like the $F^-$ parent (LEDERBERG 1957). No one really knows as yet the phenotypes of merozygotes. These facts suggest that deficient characters are possibly dominant in some conditions.

Two hypothesis are presented as possible explanations for this unusual situation.

First, the state of the chromosome having the non-dependent locus may be so fragile that it cannot function properly.

Recently, SAITO and IKEDA (1959) found a possible correlation between the ability of *Streptomyces* to undergo genetic recombination and cells with a bipartite genotype in which it was impossible to distinguish between diploidy, dicaryosis or some other double condition. SPIEGELMAN and ARONSON (1958) have speculated that the nuclear body of *B. megaterium* might have a similar structure. The second hypothesis is based upon these suggestions. Suppose that the nuclear body of *B. subtilis*, or the nuclei in the conidia of *S. coelicolor*, have a bipartite structure, and that the "anomalous heterozygotes", such as methionine-, histidine- and streptomycin-dependent, have two different genetic units, not as usual diploids but bipartite, due to enforced pairing. In such a condition, the *ade* and *try* loci behave in a classical fashion and are dominated by their wild type alleles so that the parental cell does not require adenine or tryptophane. But two unexpected actions occur at the other loci. First, for structural reasons the *met* and *his* loci dominate their wild type alleles causing a requirement for methionine and histidine; and second, the *str-r* and *str-s* loci interact to cause a streptomycin requirement. As Fig. 5b shows the loci on one chromosome dominate or interact with loci on the other. Non-disjunction of homologous chromosomes would be selected for because daughter cells containing the *met*, *his*, *str-s* chromosome will not survive on MHS. In the paired condition exchanges occur giving rise to the *try*, *str-r* and *met*, *his*, *str-r* cells.

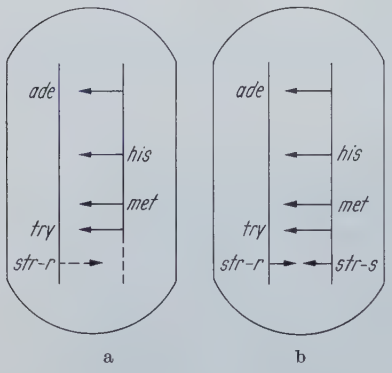



Fig. 5 a u. b. Diagram of *met, his, str-d*

On the other hand, the parent cell may have been hemizygous lacking the whole or a part of *str-s* locus (Fig. 5a), which interacts with the *str-r* locus so as to bring about streptomycin dependence.

As for the anomalous progeny, it seems too simple to attribute their appearance to a sort of heterocaryotic mutagenesis. For in *B. subtilis*, the characters achieved are *always* mucoid and uracil-dependent. But at this time, the author can neither present a new hypothesis nor offer any evidence which will exclude mutagenic action.

Further research of the mechanism is under way.

**Summary**

Some evidence was obtained that genetic interaction occurs in *Bacillus subtilis K*. A mixed inoculation of two doubly auxotrophic mutants onto appropriate media yielded tiny colonies which seemed to be initiated by heterocaryons or heterozygotes. The tiny colonies contained not only a recombinant type which acquired two characters from one or another parent, but also some abnormal types having new characters which were not recognized in either parent. The phenomenon is similar to the genetic interaction found in *Streptomyces*.

**Acknowledgment.** The author wishes to express his thanks to Prof. Y. Ikeda for his helpful suggestions all through the experiments. The author's thanks are also due to Dr. F. J. Ryan for his valuable comments and criticism of the manuscript.

**References**

Bradley, S. G.: Genetic analysis of segregants from heterocaryons of *Streptomyces coelicolor*. J. Bact. **76**, 464 (1958). — Lederberg, J.: Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. Meth. Med. Res. **3**, 5 (1950). — Lederberg, J., and E. M. Lederberg: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. **63**, 399 (1952). — Lederberg, J.: Sibling recombinants in zygote pedigrees of *Escherichia coli*. Pro. Natl. Acad. Sci. U.S. **43**, 1060 (1957). — Raper, R. J., and J. P. San Antonio: Heterocaryotic mutagenesis in *Hymenomycetes*. Amer. J. Bot. **41**, 69 (1954). — Saito, H., and Y. Ikeda: Cytogenetic studies on *Streptomyces griseoflavus*. Ann. N.Y. Acad. Sci. (in press). — Spiegelman, S., A. Aronson and P. C. Fritz-James: Isolation and characterization of nuclear bodies from *Bacillus megaterium*. J. Bact. **75**, 102 (1958). — Szybalski, W., and V. Bryson: Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. J. Bact. **64**, 489 (1952). — Tatum, E. L., and J. Lederberg: Gene recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. J. Bact. **53**, 673 (1947).

Dr. Masamichi Kohiyama, Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 356—374 (1959)

Aus dem Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität Berlin, Berlin-Dahlem

# THEORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG TETRASOMER POPULATIONEN

## II. SELBSTBEFRUCHTUNG*

Von

W. Seyffert

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 10. August 1959)*

### 1. Einleitung

Im ersten Teil dieser Arbeit (Seyffert 1960) wurde das Verhalten und die Zusammensetzung fremdbefruchtender tetrasomer Populationen untersucht. Hierbei wurde von einer „Idealpopulation" ausgegangen, für die die folgenden Voraussetzungen gelten:

1. Uneingeschränkte Panmixie,
2. unendlich große Population,
3. keine überlappenden Generationen,
4. zahlreiche Nachkommen je Individuum,
5. weder Mutation noch Selektion und
6. reguläre Meiosis (keine Chromosomenelimination, keine Uni- oder Trivalentenbildung).

Diese aus mathematischen Gründen zunächst notwendige, in der Natur jedoch selten verwirklichte Vereinfachung dient dazu, bestimmte Grundregeln abzuleiten, die durch stufenweise Veränderung einer oder mehrerer der einschränkenden Voraussetzungen variiert und den jeweiligen natürlichen Gegebenheiten mehr und mehr angepaßt werden können.

Als erste Variation wurde im ersten Teil der Arbeit der Einfluß der Selektion untersucht. Im hier vorliegenden zweiten Teil soll nun eine andere Voraussetzung aufgehoben werden: die uneingeschränkte Panmixie, wobei zusätzlich noch der Einfluß der Selektion unter diesen neuen Bedingungen variiert werden soll.

Wie schon im ersten Teil der Arbeit soll dabei besonderes Augenmerk auf die grundsätzlichen Unterschiede zwischen Populationen Di- und Tetrasomer wie auch auf den Einfluß der nur den Polysomen eigentümlichen doppelten Reduktion gerichtet werden.

Diese doppelte Reduktion ist die Folge eines Austausches zwischen dem betrachteten Locus und dem Centromer, der unter der Voraussetzung der Multivalentbildung bedingt, daß bei der Gametenbildung mit bestimmter Häufigkeit Geschwisterchromatiden in ein und denselben Gameten gelangen. Das Ausmaß der von Mather (1935, 1936) eingehend untersuchten und beschriebenen doppelten Reduktion wird mit Hilfe des Koeffizienten $\alpha$ geschätzt, der nach der Definition von Fisher und Mather (1943) die Grenzwerte $\alpha = 0$ („Chromosomenspaltung") und $\alpha = 1/7$ („Chromatidenspaltung") annehmen kann. Fisher (1949)

* Teil einer von der Fakultät für Landbau der Technischen Universität Berlin angenommenen Habilitationsschrift.

hat die Gametenausbeute tetrasomer Organismen, d. h. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Gametengenotyps, für jeden beliebigen Wert der doppelten Reduktion und für alle möglichen, in einem Locus heterozygoten Zygotengenotypen, errechnet (Tabelle 1):

Tabelle 1. *Gametenausbeute tetrasomer Genotypen bei Berücksichtigung der doppelten Reduktion*

| Symbolischer elterlicher Genotyp | Gametengenotyp | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *11* | *12* (*13*) (*14*) | *22* (*33*) (*44*) | (*23*) (*24*) (*34*) |
| *(1111)* | *1* | — | — | — |
| *(1112)* | $(2+\alpha)/4$ | $2(1-\alpha)/4$ | $\alpha/4$ | — |
| *(1122)* | $(1+2\alpha)/6$ | $4(1-\alpha)/6$ | $(1+2\alpha)/6$ | — |
| *(1123)* | $(1+2\alpha)/6$ | $2(1-\alpha)/6$ | $\alpha/4$ | $(1-\alpha)/6$ |
| *(1234)* | $\alpha/4$ | $(1-\alpha)/6$ | $\alpha/4$ | $(1-\alpha)/6$ |

In dieser Tabelle sind die Allele $a_1$, $a_2$, $a_3$ und $a_4$ in abgekürzter Schreibweise durch die Zahlen 1—4 dargestellt worden, in Klammern stehen die Gametengenotypen, die nur bei tri- und tetraallelen Eltern auftreten können. Die nachfolgenden Untersuchungen bauen im wesentlichen auf diesen Grundwahrscheinlichkeiten auf.

## 2. Untersuchung selbstbefruchtender Populationen

Bekanntlich erfahren Selbstbefruchter, sofern nicht andere Mechanismen wirksam werden, eine ständige Abnahme der Heterozygotie, die erst beendet ist, wenn der Gleichgewichtszustand — die vollkommene Homozygotie — erreicht worden ist. Dieser den Pflanzenzüchter besonders interessierende Vorgang folgt bei Disomen einer einfachen Regel:

$$H_n = \left(\frac{1}{2}\right)^n H_0, \tag{1}$$

wobei $H_n$ und $H_0$ die relative Häufigkeit der Heterozygoten in der $n$-ten und in der Ausgangspopulation kennzeichnen. Dies ist eine unendliche geometrische Reihe mit dem Quotienten $(\frac{1}{2})$, die dem Grenzwert null zustrebt, wenn man $n$ gegen unendlich wachsen läßt.

Das Problem, das es bei tetrasomem Erbgang zu lösen gilt, besteht darin, den für jede Heterozygote charakteristischen Koeffizienten der geometrischen Reihe zu finden, der es erlaubt, eine allgemeingültige Gleichung aufzustellen.

Zur Lösung derartiger Aufgaben sind verschiedene Methoden entwickelt worden, von denen die „Wahrscheinlichkeitsmethode" (vgl. Kempthorne 1957), die „Pfad-Koeffizientenmethode" von Wright und die „Matrizenmethode" von Fisher die bekanntesten sind.

Wir verwenden hier die von Fisher (1949) und noch ausführlicher von Kempthorne (1957) beschriebene Matrizenmethode, die neben einer Reihe statistischer Vorteile den Vorzug hat, daß sie an veränderte Voraussetzungen — beispielsweise die Berücksichtigung der Mutation oder der Selektion — sehr leicht angepaßt werden kann.

Die nachfolgende Ableitung, mit der die Zusammensetzung selbstbefruchtender Populationen untersucht werden soll, entspricht in ihren Grundzügen der von Fisher (1949) gegebenen, sie wurde jedoch der besseren Verständlichkeit halber abgeändert und zum Teil ausführlicher wiedergegeben.

Zunächst wird von der Tabelle (1) ausgehend die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der ein Genotyp der Konstitution $AAAA = (4,0)$, $AAAa = (3,1)$, $AAaa = (2,2)$, $Aaaa = (1,3)$ und $aaaa = (0,4)$ entsprechende Genotypen in der Folgegeneration bei Annahme vollkommener Selbstbefruchtung erzeugt. Es ergibt sich die nachfolgende Übersicht:

| | $f_0(4,0)$ | $f_0(3,1)$ | $f_0(2,2)$ | $f_0(1,3)$ | $f_0(0,4)$ |
|---|---|---|---|---|---|
| $f_1(4,0)$ | 1 | $(4 + 4\alpha + \alpha^2)$ | $(1 + 4\alpha + 4\alpha^2)$ | $(\alpha^2)$ | 0 |
| $f_1(3,1)$ | 0 | $(8 - 4\alpha - 4\alpha^2)$ | $(8 + 8\alpha - 16\alpha^2)$ | $(4\alpha - 4\alpha^2)$ | 0 |
| $f_1(2,2)$ | 0 | $(4 - 4\alpha + 6\alpha^2)$ | $(18 - 24\alpha + 24\alpha^2)$ | $(4 - 4\alpha + 6\alpha^2)$ | 0 |
| $f_1(1,3)$ | 0 | $(4\alpha - 4\alpha^2)$ | $(8 + 8\alpha - 16\alpha^2)$ | $(8 - 4\alpha - 4\alpha^2)$ | 0 |
| $f_1(0,4)$ | 0 | $(\alpha^2)$ | $(1 + 4\alpha + 4\alpha^2)$ | $(4 + 4\alpha + \alpha^2)$ | 1 |
| Divisor | 1 | 16 | 36 | 16 | 1 |

wobei $f_0(i, j)$ und $f_1(i, j)$ die relative Häufigkeit des genannten Genotyps in der Ausgangs- und in der Folgegeneration kennzeichnen. Es ist also beispielsweise die relative Häufigkeit des Typs $(3,1) = AAAa$ in der Folgegeneration:

$$f_1(3,1) = \tfrac{1}{4}(2-\alpha-\alpha^2)\, f_0(3,1) + \tfrac{1}{9}(2+2\alpha-4\alpha^2)\, f_0(2,2) + \tfrac{1}{4}(\alpha-\alpha^2)\, f_0(1,3).$$

Berücksichtigt man die Symmetriebeziehungen, die zwischen den Typen $(3,1)$ und $(1,3)$ bestehen [s. Gln. (2)], so kann das als Generationsmatrix zu bezeichnende Gleichungssystem (2) erheblich vereinfacht werden. Werden außerdem die homozygoten Genotypen weggelassen, wie schon durch die Linienführung in (2) angedeutet, da sie für die nachfolgenden Berechnungen ohne Bedeutung sind, erhält man die vereinfachte Generationsmatrix $G$ (Fisher 1949):

$$G = \begin{array}{c|cc} & f_0(3,1) & f_0(2,2) \\ \hline f_1(3,1) & (8 - 8\alpha^2) & (16 + 16\alpha - 32\alpha^2) \\ f_1(2,2) & (4 - 4\alpha + 6\alpha^2) & (18 - 24\alpha + 24\alpha^2) \\ \hline \text{Divisor} & 16 & 36 \end{array} \qquad (2\,\text{a})$$

Diese Generationsmatrix $G$ könnte unmittelbar dazu dienen, die Wahrscheinlichkeit bestimmter Genotypen der Folgegeneration zu errechnen, wie es beispielsweise Wricke (1956) gezeigt hat. Es genügte, $G$ mit dem Vektor der Ausgangsgeneration zu multiplizieren, so daß

$$\begin{pmatrix} f_1(3,1) \\ f_1(2,2) \end{pmatrix} = G \begin{pmatrix} f_0(3,1) \\ f_0(2,2) \end{pmatrix} \qquad (3)$$

ist und, zur Berechnungen der Häufigkeiten in der $n$-ten Generation,

$$\begin{pmatrix} f_n(3,1) \\ f_n(2,2) \end{pmatrix} = G^n \begin{pmatrix} f_0(3,1) \\ f_0(2,2) \end{pmatrix} \qquad (3\,\text{a})$$

gesetzt werden kann. Dieser Weg ist jedoch wenig vorteilhaft, weil das Potenzieren von Matrizen mühevoll ist. FISHER vermeidet diese Schwierigkeit, indem er die Matrix $G$ in eine Diagonalmatrix $\Lambda$ verwandelt, deren Potenzierung keinen besonderen Aufwand erfordert.

Hierzu wird von der Generationsmatrix $G$ eine Diagonalmatrix mit den Elementen $\lambda_1, \lambda_2, \ldots, \lambda_n$ subtrahiert und die Determinante der Differenz gleich null gesetzt:

$$det(G - \lambda I) = 0. \tag{4}$$

Diese, als charakteristische Gleichung der Matrix $G$ bezeichnete Beziehung führt zu den Elementen der gesuchten $\Lambda$-Matrix, den „charakteristischen Wurzeln", den „Eigenwerten" der Matrix oder den „latent roots" der angelsächsischen Literatur.

Diese $\Lambda$-Matrix kann nun nicht unmittelbar zur Multiplikation mit dem Vektor $(f_0)$ verwendet werden, sondern der Vektor $(f)$ muß, wegen der Veränderung der Matrix $G$ in eine Diagonalmatrix, zuvor mit einer Koeffizientenmatrix $C$ multipliziert werden, so daß nunmehr

$$Cf_n = \Lambda^n Cf_0 \tag{5}$$

ist. Die Elemente der Koeffizientenmatrix, von FISHER als „relative complexities" bezeichnet, werden erhalten, indem die gestürzte Matrix[1] $\overline{(G - \lambda I)}$, in die nacheinander die Werte für $\lambda_1, \lambda_2, \ldots, \lambda_n$ eingesetzt werden, mit dem Vektor $(c_i)$ multipliziert, gleich null gesetzt und nach $c_i$ aufgelöst wird. Um $(f_n)$ explizit zu erhalten, muß ein weiterer Schritt durchgeführt werden, der in der Division der Gl. (5) durch $C$ besteht. Es ist dann:

$$f_n = C^{-1} \Lambda^n C f_0, \tag{6}$$

wobei $C^{-1}$ als Inversion der Matrix $C$ bezeichnet wird, die in der obigen Gleichung wegen der vorderen Multiplikation mit $C^{-1}$ zuvor gestürzt werden muß. Eine inverse Matrix wird erhalten, indem man die ursprüngliche Matrix der Reihe nach den Vektoren $\begin{pmatrix}1\\0\end{pmatrix}, \begin{pmatrix}0\\1\end{pmatrix}$, bzw. bei einer $3 \times 3$ Matrix den Vektoren $\begin{pmatrix}1\\0\\0\end{pmatrix}, \begin{pmatrix}0\\1\\0\end{pmatrix}, \begin{pmatrix}0\\0\\1\end{pmatrix}$ gleichsetzt und auflöst. Auf diese Weise werden Koeffizienten erhalten, deren Reihensummen, gleich 1 gesetzt, die von FISHER als „limiting frequencies" bezeichneten Werte ergeben, mit deren Hilfe die „absolute complexities", Maße für den Abstand der einzelnen Genotypen von der Homozygotie, errechnet werden können.

Für das gewählte Beispiel lautet die Determinante:

$$det(G - \lambda I) = \begin{vmatrix} 8 - 8\alpha^2 - 16\lambda & 16 + 16\alpha - 32\alpha^2 \\ 4 - 4\alpha + 6\alpha^2 & 18 - 24\alpha + 24\alpha^2 - 36\lambda \end{vmatrix} = 0 \tag{4a}$$

mit der charakteristischen Gleichung

$$(8 - 8\alpha^2 - 16\lambda)(18 - 24\alpha + 24\alpha^2 - 36\lambda) - (4 - 4\alpha + 6\alpha^2)(16 + 16\alpha - 32\alpha^2) = 0$$

[1] Eine gestürzte Matrix erhält man, indem man in der Ausgangsmatrix die Zeilen- und Spaltenindizes vertauscht.

oder vereinfacht

$$\lambda^2 - \frac{1}{6}(6 - 4\alpha + \alpha^2)\lambda + \frac{1}{36}(5 - 12\alpha + 9\alpha^2 - 2\alpha^3) = 0.$$

Die Wurzeln dieser Gleichung sind:

$$\lambda_1 = \frac{1}{6}(5 - 2\alpha) \quad \text{und} \quad \lambda_2 = \frac{1}{6}(1 - \alpha)^2,$$

so daß die Diagonalmatrix $A$ lautet:

$$A = \begin{pmatrix} \frac{1}{6}(5 - 2\alpha) & 0 \\ 0 & \frac{1}{6}(1 - \alpha)^2 \end{pmatrix}.$$

Werden die Eigenwerte $\lambda_1$ und $\lambda_2$ in die gestürzte Matrix $\overline{(G - \lambda I)}$ der Reihe nach eingesetzt, ergibt sich im ersten Fall:

$$\begin{pmatrix} \frac{1}{16}(8 - 8\alpha^2) - \frac{1}{6}(5 - 2\alpha) & \frac{1}{16}(4 - 4\alpha + 6\alpha^2) \\ \frac{1}{36}(16 + 16\alpha - 32\alpha^2) & \frac{1}{36}(18 - 24\alpha + 24\alpha^2) - \frac{1}{6}(5 - 2\alpha) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

mit dem Resultat

$$-\frac{1}{6}(2 - 2\alpha + 3\alpha^2)\, c_1 + \frac{1}{8}(2 - 2\alpha + 3\alpha^2)\, c_2 = 0$$

$$\frac{4}{9}(1 + \alpha - 2\alpha^2)\, c_1 + \frac{3}{9}(1 + \alpha - 2\alpha^2)\, c_2 = 0,$$

so daß $c_1 = 3$ und $c_2 = 4$ ist.

In derselben Weise erhält man für $\lambda_2 = (1 - \alpha)^2/6$:

$$\frac{1}{3}(1 + \alpha - 2\alpha^2)\, c_1 + \frac{1}{8}(2 - 2\alpha + 3\alpha^2)\, c_2 = 0$$

$$\frac{1}{36}(1 + \alpha - 2\alpha^2)\, c_1 + \frac{1}{6}(2 - 2\alpha + 3\alpha^2)\, c_2 = 0$$

mit dem Ergebnis

$$c_1 = 3(2 - 2\alpha + 3\alpha^2) \quad \text{und} \quad c_2 = -8(1 + \alpha - 2\alpha^2),$$

so daß die Matrix $C$ lautet:

$$\begin{pmatrix} 3 & 4 \\ 3(2 - 2\alpha + 3\alpha^2) & -8(1 + \alpha - 2\alpha^2) \end{pmatrix} = C$$

und die gestürzte Inversion der Matrix:

$$C^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{8(1 + \alpha - 2\alpha^2)}{12(4 - \alpha^2)} & \frac{4}{12(4 - \alpha^2)} \\ \frac{3(2 - 2\alpha + 3\alpha^2)}{12(4 - \alpha^2)} & -\frac{3}{12(4 - \alpha^2)} \end{pmatrix}$$

ist. Die relative Häufigkeit des Genotyps *(3,1)* bzw. *(1,3)* und die des Typs *(2,2)* in der $n$-ten Generation ist demnach [Gl. (6)]:

$$f_n(3,1) = \frac{8(1+\alpha-2\alpha^2)}{12(4-\alpha^2)}\left(\frac{5-2\alpha}{6}\right)^n [3f_0(3,1)+4f_0(2,2)]$$
$$+ \frac{4}{12(4-\alpha^2)}\left[\frac{(1-\alpha)^2}{6}\right]^n [(6-6\alpha+9\alpha^2)f_0(3,1) - (8+8\alpha-16\alpha^2)f_0(2,2)]$$
$$f_n(2,2) = \frac{3(2-2\alpha+3\alpha^2)}{12(4-\alpha^2)}\left(\frac{5-2\alpha}{6}\right)^n [3f_0(3,1)+4f_0(2,2)]$$
$$- \frac{3}{12(4-\alpha^2)}\left[\frac{(1-\alpha)^2}{6}\right]^n [(6-6\alpha+9\alpha^2)f_0(3,1) - (8+8\alpha-16\alpha^2)f_0(2,2)].$$

Wird beispielsweise angenommen, daß die Ausgangspopulation nur aus Duplextypen *(AAaa)* bestanden habe, d.h. $f_0(3,1) = 0$ und $f_0(2,2) = 1$, so ist bei Annahme von Chromosomenspaltung $(\alpha = 0)$:

$$f_n(3,1) = \frac{2}{3}\left[\left(\frac{5}{6}\right)^n - \left(\frac{1}{6}\right)^n\right] f_0(2,2)$$

und

$$f_n(2,2) = \frac{1}{2}\left[\left(\frac{5}{6}\right)^n + \left(\frac{1}{6}\right)^n\right] f_0(2,2),$$

ein Ergebnis, das mit dem von Li (1955) für diesen Fall angegebenen übereinstimmt. Die Zahl der Heterozygoten in der $n$-ten Generation ist dann, da $H_n = f_n(3,1) + f_n(2,2)$ ist,

$$\left.\begin{aligned} H_n = {} & \frac{14+2\alpha-7\alpha^2}{12(4-\alpha^2)}\left(\frac{5-2\alpha}{6}\right)^n [3f_0(3,1)+4f_0(2,2)] \\ & + \frac{1}{12(4-\alpha^2)}\left[\frac{(1-\alpha^2)}{6}\right]^n [(6-6\alpha-9\alpha^2)f_0(3,1) - (8+8\alpha-16\alpha^2)f_0(2,2)], \end{aligned}\right\} \quad (7)$$

wobei der zweite Teil der Gl. (7) bei großem $n$ vernachlässigt werden kann, so daß daraus die von Fisher (1949) angegebene Näherungslösung resultiert.

Werden in diese Gleichung die Grenzwerte für die Chromosomen- und Chromatidenspaltung $(\alpha = 0$ und $\alpha = 1/7)$ eingesetzt, ergeben sich, wenn die Ausgangspopulation einheitlich aus Duplextypen bestand, d.h. $f_0(3,1) = 0$ und $f_0(2,2) = 1$, die nachfolgenden Lösungen für den Fall der Chromosomenspaltung:

$$H_n = \frac{7}{6}\left(\frac{5}{6}\right)^n H_0 - \left(\frac{1}{6}\right)^{n+1} H_0$$

und für die Chromatidenspaltung:

$$H_n = \frac{77}{65}\left(\frac{11}{14}\right)^n H_0 - \frac{12}{65}\left(\frac{6}{49}\right)^n H_0.$$

Entsprechend findet man für eine aus Triplex-(Simplex-)typen bestehende Ausgangspopulation:

$$H_n = \frac{7}{8}\left(\frac{5}{6}\right)^n H_0 + \frac{1}{8}\left(\frac{1}{6}\right)^n H_0$$

bzw.

$$H_n = \frac{231}{260}\left(\frac{11}{14}\right)^n H_0 + \frac{29}{260}\left(\frac{6}{49}\right) H_0.$$

Der Grenzwert der Heterozygotenhäufigkeit ist erreicht, wenn

$$\lim_{n\to\infty} f_n(i,j) = C^{-1}A^n C f_0(i,j) = 0 \tag{8}$$

ist, d. h. es liegt dann vollkommene Homozygotie vor.

Mit Hilfe der Generationsmatrix-Methoden kann also die Zusammensetzung einer beliebigen Selbstungsgeneration [mit Hilfe der Gln. (6) und (7)] leicht errechnet werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methoden besteht darin, daß sie, wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, beliebig abgewandelt werden können. Außerdem ermöglichen die charakteristischen Wurzeln oder Eigenwerte der Generationsmatrix unmittelbare Vergleiche der Inzuchtwirkung verschiedener Systeme. Wie aus der Gl. (7) hervorgeht, hat mit wachsendem $n$ nur noch der Koeffizient $\lambda_I = (5 - 2\alpha)/6$ Bedeutung, der daher von FISHER als „dominant latent root" bezeichnet und mit dem Symbol $\lambda_D$ versehen wird. Wir verwenden im folgenden die Bezeichnung „dominierender Eigenwert".

Zum Vergleich verschiedener Systeme verwendet FISHER (1949) die äquivalente Zahl der Generationen, in der der gleiche Inzuchtgrad erreicht wird, und gibt als Näherungswert für großes $n$ die Beziehung

$$1/-\ln \lambda_D \tag{9}$$

an. Dieses Relativmaß ermöglicht anschauliche Vergleiche (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Vergleich der Inzuchtwirkung von di- und tetrasomen Selbstbefruchtern*

| Spaltungstyp | $\lambda_D$ | $1/-\ln \lambda_D$ |
|---|---|---|
| Disome Spaltung . . . . . | 0.5 | 1.443 |
| Chromatidenspaltung . . . | 0.786 | 4.146 |
| Chromosomenspaltung. . . | 0.833 | 5.485 |

Aus dieser Tabelle geht eindeutig hervor, daß die Tetrasomie ein wirkungsvoller Mechanismus gegen die Heterozygotenabnahme in Populationen von Selbstbefruchtern ist. Es ist bemerkenswert, daß dabei die Lage des untersuchten Locus im Hinblick auf das Centromer bzw. die Häufigkeit der Multivalentbildung (die im Koeffizienten $\alpha$ ihren Ausdruck finden) keineswegs ohne Bedeutung ist. Wird beispielsweise angenommen, daß die heterozygoten Träger der betrachteten Allele selektive Vorteile haben, so wäre es unter diesen Umständen (vgl. auch SEYFFERT 1960) durchaus verständlich, wenn Linien mit verminderter Fähigkeit zur Multivalentbildung begünstigt würden, da, wie aus Tabelle (2) hervorgeht, die geringste Heterozygotenabnahme bei reiner Chromosomenspaltung zu beobachten ist.

Der Unterschied zwischen di- und tetrasomen Selbstbefruchtern kann indessen auch auf andere Weise charakterisiert werden. DEMARLY (1958) verwendet hierzu den Quotienten

$$Q_n = H_n(tetra)/H_n(di), \tag{10}$$

für den von ihm für den Fall der Chromosomenspaltung die folgenden Werte angegeben werden: $Q_1 = 1.9$, $Q_2 = 3.2$, $Q_5 = 15.0$ und $Q_{10} = 192.2$. Wir haben die entsprechenden Werte für die Chromatidenspaltung errechnet, sie lauten: $Q_1 = 1.8$, $Q_2 = 2.9$, $Q_5 = 11.3$ und $Q_{10} = 108.7$. Graphisch dargestellt ergibt sich aus diesen Werten das folgende Bild (Abb. 1).

Es muß jedoch davor gewarnt werden, diese Darstellung bzw. diesen Quotienten allzu unkritisch zu betrachten, da er zwar ein eindrucksvolles, leider aber auch verzerrtes Bild vermittelt. Es wäre ein rapider Anstieg dieses Quotienten auch dann und in noch stärkerem Maße zu erwarten, wenn die Zahl der Heterozygoten in der tetrasomen Population konstant bliebe. Es ist beispielsweise

$$Q_{10} = 192.2 = \frac{0.188423}{0.000976},$$

d. h., daß bei Chromosomenspaltung etwa 18% Heterozygote in der 10. Selbstungsgeneration (von einem Duplextyp ausgehend) vorhanden sind, während bei Disomen nur 1/1024 aller Typen noch heterozygot ist. Diese Zahlen rücken die wahren Verhältnisse besser ins rechte Licht.

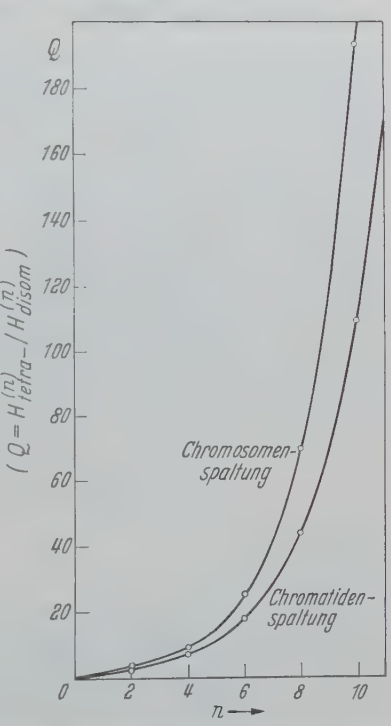



Abb. 1. Relative Heterozygotenhäufigkeit in tetrasomen Selbstungsnachkommenschaften

*Selbstbefruchtung und Selektion*

Es soll nun die Möglichkeit untersucht werden, daß bei selbstbefruchtenden tetrasomen Organismen ein bestimmter Zygoten- oder Gametengenotyp benachteiligt ist. Der einfachste Fall ist dann gegeben, wenn eine Genotypenklasse völlig ausfällt, d. h. letal ist, so daß $s = 1$ und $1 - s = 0$ ist.

*Zygotische Letalfaktoren*

Parsons (1957) hat unter der Annahme der Chromosomenspaltung den Fall untersucht, daß der rezessive Genotyp $(a_4)$ letal ist. Er erhielt die charakteristische Gleichung:

$$210\lambda^3 - 353\lambda^2 + 168\lambda - 20 = 0$$

und die Eigenwerte

$$\lambda_1 = 0.932717,\ \lambda_2 = 0.568683 \text{ und } \lambda_3 = 0.179552.$$

Da diese Werte nur für den speziellen Fall der Chromosomenspaltung gelten, wird hier die für jeden beliebigen Wert von $\alpha$ gültige Lösung abgeleitet.

Gehen wir von den in der Tabelle (1) niedergelegten Gametenwahrscheinlichkeiten aus und verwenden sie zur Berechnung der Generationsmatrix unter der Annahme der vollkommenen Selbstbefruchtung und der Letalität des rezessiven Genotyps ($a^4$), so erhalten wir:

| | $f_0(3,1)$ | $f_0(2,2)$ | $f_0(1,3)$ |
|---|---|---|---|
| $f_1(3,1)$ | $8 - 4\alpha - 4\alpha^2$ | $8 + 8\alpha - 16\alpha^2$ | $4\alpha - 4\alpha^2$ |
| $f_1(2,2)$ | $4 - 4\alpha + 6\alpha^2$ | $18 - 24\alpha + 24\alpha^2$ | $4 - 4\alpha + 6\alpha^2$ |
| $f_1(1,3)$ | $4\alpha - 4\alpha^2$ | $8 + 8\alpha - 16\alpha^2$ | $8 - 4\alpha - 4\alpha^3$ |
| *Divisor* | $16 - \alpha^2$ | $35 - 4\alpha - 4\alpha^2$ | $12 - 4\alpha - \alpha^2$ |

(11)

In diesem Fall ist es nicht, wie bei Gl. (2a), möglich die Wahrscheinlichkeiten von (3,1) und (1,3) zusammenzufassen, da die Symmetrieverhältnisse innerhalb der Generationsmatrix (s. Spaltendivisor) infolge der Selektionswirkung aufgehoben worden sind.

Die charakteristische Gleichung lautet in diesem Fall:

$$\left.\begin{aligned}
&[(8-4\alpha-4\alpha^2)-\lambda(16-\alpha^2)][(18-24\alpha+24\alpha^2)-\lambda(35-4\alpha-4\alpha^2)]\\
&\quad\times[(8-4\alpha-\alpha^2)-\lambda(12-4\alpha-\alpha^2)]\\
&\quad+2(4\alpha-4\alpha^2)(4-4\alpha+6\alpha^2)(8+8\alpha-16\alpha^2)\\
&\quad-(4\alpha-4\alpha^2)^2[(18-24\alpha+24\alpha^2)-\lambda(35-4\alpha-4\alpha^2)]\\
&\quad-(8+8\alpha-16\alpha^2)(4-4\alpha+6\alpha^2)[(8-4\alpha-4\alpha^2)-\lambda(28-4\alpha-2\alpha^2)]=0
\end{aligned}\right\}\quad(12)$$

oder entsprechend umgeformt:

$$\begin{aligned}
&\lambda^3(16-\alpha^2)(35-4\alpha-4\alpha^2)(12-4\alpha-\alpha^2)\\
&\quad-\lambda^2[6(16-\alpha^2)(3-4\alpha+4\alpha^2)(12-4\alpha-\alpha^2)\\
&\quad+8(35-4\alpha-4\alpha^2)(2-\alpha-\alpha^2)(14-2\alpha-\alpha^2)]\\
&\quad+\lambda\{16(14-2\alpha-\alpha^2)[3(3-4\alpha+4\alpha^2)(2-\alpha-\alpha^2)\\
&\quad-2(1+\alpha-2\alpha^2)(2-2\alpha+3\alpha^2)]\\
&\quad+64(35-4\alpha-4\alpha^2)(1-\alpha-\alpha^2+\alpha^3)\}\\
&\quad-384(3-4\alpha+4\alpha^2)(1-\alpha-\alpha^2+\alpha^3)\\
&\quad+256(1+\alpha-2\alpha^2)(2-2\alpha+3\alpha^2)(1-\alpha)=0,
\end{aligned}$$

beziehungsweise:

$$\begin{aligned}
&\lambda^3(6720-3008\alpha-1492\alpha^2+508\alpha^3+131\alpha^4-20\alpha^5-4\alpha^6)\\
&\quad-\lambda^2(11296-11696\alpha+1400\alpha^2+1072\alpha^3-118\alpha^4-56\alpha^5-8\alpha^6)\\
&\quad+\lambda(5376-10336\alpha+5984\alpha^2-912\alpha^3-80\alpha^4-32\alpha^5)\\
&\quad-(640-2176\alpha+2688\alpha^2-1408\alpha^3+256\alpha^4)=0.
\end{aligned}$$

Werden in diese Gleichung die Grenzwerte $\alpha=0$ und $\alpha=1/7$ eingesetzt, resultiert daraus im ersten Fall die von Parsons abgeleitete Gleichung, im zweiten die für die Chromatidenspaltung gültige. Diese charakteristische Gleichung lautet:

$$9094371\lambda^3-1402066\lambda^2+583721\lambda-551936=0$$

und hat die Eigenwerte

$$\lambda_1=0.910618856,\ \lambda_2=0.497770483\quad\text{und}\quad\lambda_3=0.133890880.$$

Werden in die gestürzte Matrix $\overline{(G-\lambda I)}$ nacheinander die Werte $\lambda_1$, $\lambda_2$ und $\lambda_3$ eingesetzt, die so entstandenen Gleichungen mit dem Vektor $\begin{pmatrix}c_1\\c_2\\c_3\end{pmatrix}$ multipliziert

und gleich null gesetzt, erhält man die „relative complexities“:

$$C = \begin{pmatrix} 0.084992 & 0.146890 & 0.185182 \\ 0.167318 & 0.049987 & -0.154969 \\ 0.736509 & -1.169979 & 0.651925 \end{pmatrix}$$

mit der gestürzten Inversion der Matrix

$$C^{-1} = \begin{pmatrix} 5.603872 & 3.530300 & 0.361821 \\ 2.522289 & 0.915059 & -0.498948 \\ 2.628049 & -2.346126 & 0.229714 \end{pmatrix}.$$

Mit Hilfe dieser Werte kann, wie auf S. 361 gezeigt, die Zusammensetzung einer beliebigen Selbstungsgeneration ermittelt werden. Da sich eine erneute Darstellung dieses Vorganges erübrigt, soll an dieser Stelle noch eine andere Eigentümlichkeit der Matrizenmethoden besprochen werden.

Wie schon im Zusammenhang mit der Gl. (7) bemerkt wurde, ist bei großem $n$ nur noch der dominierende Eigenwert $\lambda_D$ von Bedeutung, während die kleineren Eigenwerte vernachlässigt werden können. Wenn vergleichende Betrachtungen über Populationen, für die verschiedene Voraussetzungen gelten, angestellt werden sollen, können die Gleichungen, immer unter der Voraussetzung, daß die Zahl der Generationen $n$ nicht klein ist, erheblich vereinfacht werden.

Setzt man zur Vereinfachung der Darstellung die relativen Häufigkeiten $f(3.1) = x$, $f(2.2) = y$ und $f(1.3) = z$, dann wird im vorliegenden Beispiel bei Vernachlässigung von $\lambda_2$ und $\lambda_3$ aus

$$\left.\begin{aligned} Cf &= (0.084992 \quad 0.146890 \quad 0.185182)\begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \\ &= 0.084992\,x + 0.146890\,y + 0.185182\,z = L, \end{aligned}\right\} \tag{13}$$

wobei $L$ von Fisher (1949) als „principal linear component of frequency“ und die Koeffizienten von $x$, $y$ und $z$ als „relative complexities“ bezeichnet werden.

Setzt man die zu $\lambda_D$ gehörige Spaltensumme der gestürzten Matrix $C^{-1}$ gleich 1, so erhält man für $x$, $y$ und $z$ die folgenden Werte:

$$\begin{aligned} x &= 0.521086 \\ y &= 0.234540 \\ z &= 0.244374, \end{aligned}$$

die als „limiting frequencies“ bezeichnet werden. Diese Werte werden in die lineare Funktion $L$ eingesetzt und ergeben dann die „durchschnittliche relative complexity“ von $L = 0.123993$. Wird die Gleichung in $L$ dann durch diesen Wert dividiert, resultieren daraus die „absolute complexities“:

$$\begin{aligned} X &= 0.685458 \\ Y &= 1.184664 \\ Z &= 1.493487, \end{aligned}$$

die Fisher (1949) zur Schätzung des Abstandes eines bestimmten Genotyps von der Homozygotie verwendet. Bezeichnet man die absolute complexity des $i$-ten

Genotyps mit $c_i$ und setzt eine absolute complexity von 1 als Standard ein, dann ist die Zahl der Generationen, um die der $i$-te Genotyp dem Standard voraus oder ihm gegenüber zurück ist nach FISHER (s. auch KEMPTHORNE 1957) zu erhalten aus der Beziehung:

$$log\ c_i / log\ (1/\lambda_D). \tag{14}$$

Führt man diese Berechnung für die bisher untersuchten Beispiele durch, so erhält man die in der Tabelle (3) zusammengefaßten Ergebnisse.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ist der Genotyp (2,2) 0.702 bzw. 0.845 Generationen hinter dem Standard zurück, während die Tri- und Simplextypen 0.490 bzw. 0.732 Generationen voraus sind, d. h. sie befinden sich auf dem Wege zur Homozygotie in der günstigsten Position. Gleichzeitig wird durch den Vergleich der Chromosomen- und Chromatidenspaltung offenbar, daß das Vorkommen doppelter Reduktion die Verhältnisse zwischen den heterozygoten Genotypen verändert: Tri- bzw. Simplextypen sind bei Chromatidenspaltung gegenüber dem Duplextyp weniger begünstigt als bei Chromosomenspaltung.

Tabelle 3. *Zahl der Generationen, die die verschiedenen tetrasomen Genotypen bei Annäherung an die Homozygotie im Hinblick auf den Standard = 1 voraus oder zurück sind*

| Spaltungstyp | Genotyp | | |
|---|---|---|---|
| | (3,1) | (2,2) | (1,3) |
| Chromatidenspaltung . . . | — 0.490 | 0.702 | — 0.490 |
| Chromosomenspaltung. . . | — 0.732 | 0.845 | — 0.732 |
| *($a^4$) letal* | | | |
| Chromatidenspaltung . . . | — 4.033 | 1.810 | 4.248 |
| Chromosomenspaltung. . . | — 7.842 | 0.034 | 3.271 |

Tabelle 4. *Abhängigkeit des dominierenden Eigenwertes und der äquivalenten Zahl der Generationen vom Ausmaß der doppelten Reduktion*

| Ohne Selektion | | | ($a^4$) letal | |
|---|---|---|---|---|
| $\alpha$ | $\lambda_D$ | $1/-ln\ \lambda_D$ | $\lambda_D$ | $1/-ln\ \lambda_D$ |
| 0.00 | 0.833333 | 5.485 | 0.932717 | 14.357 |
| 0.02 | 0.826666 | 5.253 | 0.929769 | 13.733 |
| 0.04 | 0.82 | 5.039 | 0.926776 | 13.150 |
| 0.06 | 0.813333 | 4.840 | 0.923739 | 12.606 |
| 0.08 | 0.806666 | 4.654 | 0.920654 | 12.097 |
| 0.10 | 0.8 | 4.481 | 0.917518 | 11.617 |
| 0.12 | 0.793333 | 4.319 | 0.914330 | 11.165 |
| 1/7 | 0.785714 | 4.146 | 0.910619 | 10.680 |

Bemerkenswert ist nun die Auswirkung der Selektion gegen den rezessiven Genotyp ($a^4$). Hier sind die Verhältnisse völlig verändert. Der Simplextyp, der im Normalfall dem Standard voraus ist, ist nunmehr um 4.248 bzw. 3.271 Generationen hinter ihm zurück und somit in der Fähigkeit, Homozygote zu bilden, am stärksten eingeschränkt.

Demgegenüber ist der Triplextyp dem Standard um 4.033 bzw. um 7.842 Generationen voraus und damit der Homozygotie am nächsten.

Um den Zusammenhang zwischen doppelter Reduktion und Selektion eingehender untersuchen zu können, wurden die charakteristischen Gleichungen nach (12) für verschiedene Werte der doppelten Reduktion errechnet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle (4) zusammengefaßt worden.

Aus dieser Tabelle ist zweierlei zu ersehen: der dominierende Eigenwert verhält sich zum Wert der doppelten Reduktion reziprok proportional. Der Pro-

portionalitätsfaktor ist ohne Selektion = 1/3, mit Selektion etwa 0.152. Zweitens ist die äquivalente Zahl der Generationen bei Vorliegen von Selektion sehr viel größer als ohne Selektion, und die Differenz zwischen dem Wert für $\alpha = 0$ und dem für $\alpha = 1/7$ ist bei Letalität eines homozygoten Genotyps gegenüber dem Normalfall beträchtlich angestiegen. Diese Zusammenhänge sind an Hand der graphischen Darstellung (Abb. 2) noch besser zu erkennen.

In dieser Abbildung ist einerseits $\lambda_D$ und andererseits $1/-\ln\lambda_D$ gegen $\alpha$ aufgetragen worden. Man erkennt auf den ersten Blick, daß die Selektion, deren Tendenz ganz allgemein in einer Erhöhung der Zahl der äquivalenten Generationen besteht, im Zusammenhang mit der doppelten Reduktion, die ihrerseits diese Zahl vermindert, in ihrer Wirkung erheblich eingeschränkt wird. *Das bedeutet, daß die doppelte Reduktion im Zusammenhang mit der Selektion als ein die Selektionswirkung relativ vermindernder Faktor wirkt.* Oder anders ausgedrückt: Loci am distalen Ende eines Chromosoms erfahren bei Letalität eines homozygoten Genotyps im Vergleich zu proximal gelegenen eine relativ schnellere Abnahme der Heterozygotie als es im Normalfall, ohne Selektion, möglich wäre. Dies geht auch aus der nebenstehenden Abb. (3), wenn auch nicht so deutlich, hervor. In dieser Darstellung wurde die Heterozygotenhäufigkeit tetrasomer Organismen unter den oben bereits behandelten Bedingungen im Vergleich zu der der Disomen gegen die Zahl der Generationen $n$ aufgetragen. Bemerkenswert ist an diesem Vergleich, daß die Selektion in Hinblick auf die Heterozygotenabnahme bei Disomen eine sehr viel geringere Wirkung als bei Tetrasomen hat. Das heißt, daß

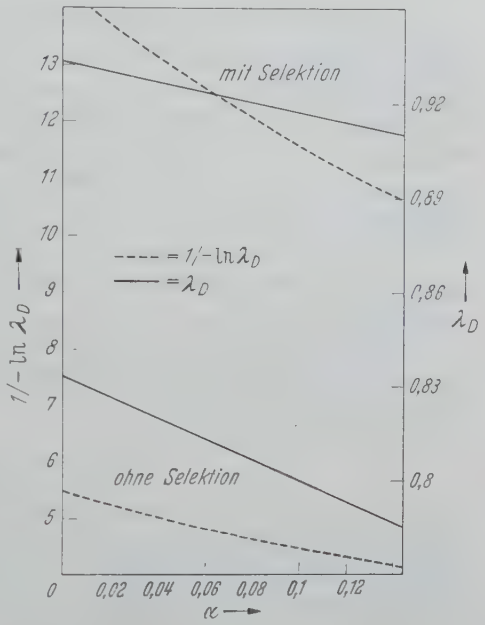



Abb. 2. Abhängigkeit des dominierenden Eigenwertes und der äquivalenten Zahl der Generationen von der doppelten Reduktion

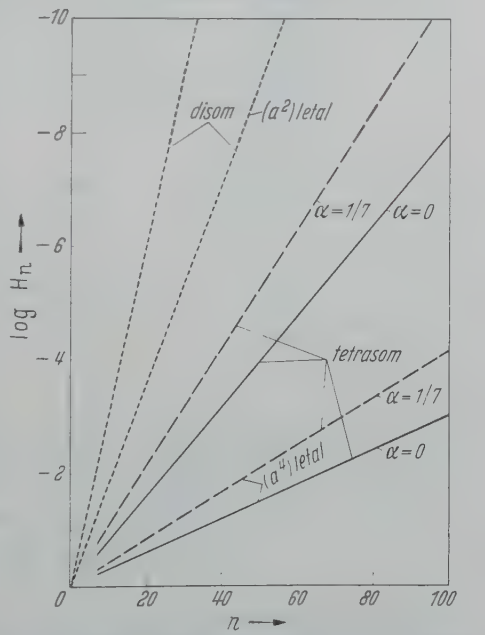



Abb. 3. Heterozygotenabnahme in di- und tetrasomen Selbstungsnachkommenschaften in Abhängigkeit von der doppelten Reduktion und der Selektion

das Vorkommen eines letalen Genotyps bei Tetrasomen den Inzuchtprozeß wesentlich stärker reduziert als bei Disomen. *Somit ist die Tetrasomie in Hinblick auf die Heterozygotenabnahme nicht, wie vielleicht angenommen werden könnte, ein die Selektionswirkung reduzierender, sondern vielmehr ein sie fördernder Faktor.*

In Maß und Zahl ausgedrückt, wird diese Regel noch besser illustriert. Vergleicht man die Quotienten „$ln\,\lambda_D(normal)/ln\,\lambda_D(rez.\ letal)$", die angeben, wieviel Generationen bei Letalität des rezessiven Genotyps erforderlich sind, um denselben Inzuchtgrad wie bei einer Generation ohne Selektion zu erreichen, so erhält man für disome Spaltung 1.7095, für Chromatidenspaltung 2.5757 und für Chromosomenspaltung 2.6175.

Auf Disome als Standard bezogen, wirkt die Selektion bei Chromatidenspaltung 1.506, bei Chromosomenspaltung 1.531mal stärker in Hinblick auf die Erhaltung der Heterozygotie.

### *Gonische Letalfaktoren*

Es sei zunächst der in der Natur nicht selten zu beobachtende Fall untersucht, daß ein Gonentyp, beispielsweise der Pollen, wie bei *Matthiola incana* (Kappert 1937 und Fiedler 1957), von der Wirkung eines rezessiven Letalfaktors betroffen sei[1]. In diesem Fall erhält die Generationsmatrix die folgende Form

| | $f_0(3,1)$ | $f_0(2,2)$ | $f_0(1,3)$ |
|---|---|---|---|
| $f_1(3,1)$ | $8-4\alpha-4\alpha^2$ | $8+8\alpha-16\alpha^2$ | $4\alpha-4\alpha^2$ |
| $f_1(2,2)$ | $4-6\alpha+5\alpha^2$ | $17-28\alpha+20\alpha^2$ | $4-6\alpha+5\alpha^2$ |
| $f_1(1,3)$ | $2\alpha-2\alpha^2$ | $4+4\alpha-8\alpha^2$ | $4-2\alpha-2\alpha^2$ |
| *Divisor* | $16-4\alpha$ | $30-12\alpha$ | $8-4\alpha$ |

(15)

so daß die charakteristische Gleichung aus der Determinante

$$\begin{vmatrix} (8-4\alpha-4\alpha^2)-\lambda(16-4\alpha) & (8+8\alpha-16\alpha^2) & (4\alpha-4\alpha^2) \\ (4-6\alpha+5\alpha^2) & (17-28\alpha+20\alpha^2)-\lambda(30-12\alpha) & (4-6\alpha+5\alpha^2) \\ (2\alpha-2\alpha^2) & (4+4\alpha-8\alpha^2) & (4-2\alpha-2\alpha^2)-\lambda(8-4\alpha) \end{vmatrix} =$$

erhalten werden kann:

$$\begin{aligned} &\lambda^3(480-552\alpha+204\alpha^2-24\alpha^3) \\ &-\lambda^2(752-1264\alpha+708\alpha^2-146\alpha^3+4\alpha^4) \\ &+\lambda(328-798\alpha+687\alpha^2-247\alpha^3+30\alpha^4) \\ &-(36-132\alpha+180\alpha^2-108\alpha^3-24\alpha^4)=0. \end{aligned}$$

[1] Das vorliegende Beispiel ist nicht unmittelbar auf *Matthiola* anwendbar, da der gonische Letalfaktor bei *Matthiola* mit einem Gen für Blütenfüllung gekoppelt ist. Gefüllt blühende $(+s/+s/+s/+s)$-Genotypen fallen wegen der Sterilität der Blüten für die Weitervermehrung aus. Der Pollen vom Typ *(letS/letS)* ist letal, so daß der Divisor der obigen Generationsmatrix die Werte $(12-8\alpha-\alpha^2)$, $(29-16\alpha-4\alpha^2)$ und $(8-4\alpha-\alpha^2)$ annimmt und die Eigenwerte bei Chromosomenspaltung $\lambda_1=1.0$, $\lambda_2=0.572029$, $\lambda_3=0.180844$ und bei Chromatidenspaltung $\lambda_1=1.0$, $\lambda_2=0.533399$, $\lambda_3=0.143883$ lauten.

Die charakteristischen Gleichungen für den Fall der Chromosomen- und Chromatidenspaltung lauten:

$$\alpha = 0: \qquad 480\lambda^3 - 752\lambda^2 + 328\lambda - 36 = 0$$

$$\alpha = 1/7: \quad 6006\lambda^3 - 8677\lambda^2 + 3369\lambda - 304 = 0.$$

Die Ergebnisse, die aus dieser Gleichung, wie auf S. 358ff. dargestellt, abzuleiten sind, werden im folgenden tabellarisch zusammengefaßt.

Tabelle 5. *Übersicht über die für das Beispiel eines auf die Pollen wirkenden Letalfaktors erhaltenen Rechenergebnisses*

| Symbol | Chromosomenspaltung | Chromatidenspaltung |
|---|---|---|
| $\lambda_1 =$ | 0.9 | 0.862249 |
| $\lambda_2 =$ | 0.5 | 0.452842 |
| $\lambda_3 =$ | 0.166666 | 0.129631 |
| $C =$ | $\begin{pmatrix} 0.96 & 1.248 & 1.2 \\ 5.777777 & -0.444444 & 2.0 \\ 3.111111 & -0.518518 & -4.666666 \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} 0.098796 & 0.165204 & 0.213946 \\ -0.116129 & -0.004685 & 0.232894 \\ -0.248317 & 0.030054 & -0.032957 \end{pmatrix}$ |
| $C^{-1} =$ | $\begin{pmatrix} 0.073261 & 0.122493 & 0.071335 \\ 0.781453 & -0.193410 & 0.118055 \\ -0.037987 & 0.103152 & -0.179846 \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} 0.577247 & -7.330569 & -3.329123 \\ 5.199702 & -0.420558 & 4.035568 \\ 0.392431 & 3.709872 & -1.578836 \end{pmatrix}$ |
| $x =$ | 0.089701 | 0.093566 |
| $y =$ | 0.956811 | 0.842824 |
| $z =$ | −0.046512 | 0.063609 |
| $X =$ | 0.7840 | 0.6095 |
| $Y =$ | 1.0193 | 1.0192 |
| $Z =$ | 0.9801 | 1.3199 |
| $\frac{\log c_i}{\log(1/\lambda_D)}$ | −2.3096<br>0.1814<br>−0.1908 | −3.3402<br>0.1283<br>1.8724 |
| $1/-\ln \lambda_D$ | 9.4912 | 6.7466 |

Bevor dieses Ergebnis besprochen wird, soll noch ein weiterer Fall untersucht werden, in dem angenommen wird, daß sowohl der Pollen als auch die Eizellen von der Wirkung eines rezessiven gonischen Letalfaktors betroffen werden. In diesem Fall erhält die Generationsmatrix die folgende Form:

| | $f_0(3,1)$ | $f_0(2,2)$ | $f_0(1,3)$ |
|---|---|---|---|
| $f_1(3,1)$ | $8 - 4\alpha - 4\alpha^2$ | $8 + 8\alpha - 16\alpha^2$ | 0 |
| $f_1(2,2)$ | $4 - 8\alpha + 4\alpha^2$ | $16 - 32\alpha + 16\alpha^2$ | 0 |
| $f_1(1,3)$ | 0 | 0 | 0 |
| *Divisor* | $16 - 8\alpha + \alpha^2$ | $24 - 20\alpha + 4\alpha^2$ | 0 |

(16)

so daß die charakteristische Gleichung wie folgt geschrieben werden kann:

$$\lambda^2(400 - 520\alpha + 249\alpha^2 - 52\alpha^3 + 4\alpha^4)$$
$$-\lambda 12(38 - 75\alpha + 45\alpha^2 - 8\alpha^3)$$
$$+ 96(1 - 3\alpha + 3\alpha^2 - \alpha^3) = 0.$$

Setzt man für $\alpha$ die Werte 0 und 1/7 ein, so resultieren daraus die folgenden Gleichungen:

$$\alpha = 0: \qquad 50\lambda^2 - 57\lambda + 12 = 0$$
$$\alpha = 1/7: \; 9801\lambda^2 - 10024\lambda + 1792 = 0.$$

In diesem Fall sind die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse zu erhalten (siehe Tabelle 6).

Die wichtigste Information, die aus den Daten der beiden letzten Beispiele zu erhalten ist, ist zweifellos die über die Abhängigkeit des Inzuchtgrades von der Art der Selektion, der doppelten Reduktion und von der Interaktion zwischen doppelter Reduktion und Selektion.

Tabelle 6. *Übersicht über die für das Beispiel eines auf männliche und weibliche Gonen wirkenden Letalfaktors erhaltenen Ergebnisses*

| Symbol | Chromosomenspaltung | Chromatidenspaltung |
|---|---|---|
| $\lambda_1 =$ | 0.861376 | 0.791853 |
| $\lambda_2 =$ | 0.278624 | 0.230899 |
| $C =$ | $\begin{pmatrix} 0.114628 & 0.165696 \\ 0.141931 & -0.125680 \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} 1.911589 & 2.884125 \\ -1.947473 & 2.592227 \end{pmatrix}$ |
| $C^{-1} =$ | $\begin{pmatrix} 3.314014 & 4.369176 \\ 3.742516 & -3.022596 \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} 0.245197 & -0.272807 \\ 0.184210 & 0.180816 \end{pmatrix}$ |
| $x =$ | 0.469638 | 0.571013 |
| $y =$ | 0.530362 | 0.428987 |
| $X =$ | 0.808879 | 0.820849 |
| $Y =$ | 1.169238 | 1.238462 |
| $\log c_i$ | −1.4213 | −0.8459 |
| $\log(1/\lambda_D)$ | 1.0477 | 0.9164 |
| $1/-\ln \lambda_D$ | 6.7013 | 4.2849 |

Als objektives Maß für den Inzuchtgrad vergleichen wir die äquivalente Zahl der Generationen an Hand des Koeffizienten $1/-\ln \lambda_D$.

Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, tritt die stärkste Erhöhung des Heterozygotenanteils bei Selektion gegen den rezessiven Zygotengenotyp auf, während die geringste Erhöhung gegenüber dem Normalfall bei Selektion gegen beide rezessiven Gonen, d. h. gegen die Pollen und die Eizellen, die den Letalfaktor homoallel tragen, zu beobachten ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei

Tabelle 7. *Vergleich der äquivalenten Zahl der Generationen, in der der gleiche Inzuchtgrad erreicht ist, in Abhängigkeit von der Art der Selektion*

| Spaltungstyp | Keine Selektion | Rezessive Zygote letal | ♂ Gonen rezessiv letal | ♂ + ♀ Gonen rezessiv letal |
|---|---|---|---|---|
| Disome Spaltung . . . . . | 1.443 | 2.466 | 1.443 | — |
| Chromatidenspaltung . . . . . | 4.146 | 10.680 | 6.747 | 4.285 |
| Chromosomenspaltung . . . . . | 5.485 | 14.357 | 9.491 | 6.701 |

gonischen Letalfaktoren auch die Heterozygotenhäufigkeit unmittelbar reduziert wird, die im extremsten Fall — disome Spaltung, männliche und weibliche

Gonen rezessiv letal — dazu führt, daß keine Heterozygoten gebildet werden. Ein System also, das bei Disomie überhaupt nicht existenzfähig wäre.

Um die Wirkung der Selektion noch besser beurteilen zu können, werden die Quotienten [$log\ \lambda_D$ (ohne Selektion)]/[$log\ \lambda_D$ (mit Selektion)] gebildet.

Tabelle 8. *Vergleich der Quotienten* [$log\ \lambda_D$ (ohne)]/[$log\ \lambda_D$ (mit Selektion)]

| Spaltungstyp | Keine Selektion | Rezessive Zygote letal | ♂ Gonen rezessiv letal | ♂ + ♀ Gonen rezessiv letal |
|---|---|---|---|---|
| Disome Spaltung . . . . . | 1.0 | 1.709 | 1.0 | — |
| Chromatidenspaltung . . . . . | 1.0 | 2.576 | 1.627 | 1.033 |
| Chromosomenspaltung . . . . . | 1.0 | 2.618 | 1.730 | 1.222 |

Während bei Disomen gonische Letalfaktoren, die nur einen Gonentyp, d. h. die männlichen oder die weiblichen Gonen, betreffen, bedingen, daß das ursprüngliche Homo-/Heterozygotenverhältnis exakt wiederhergestellt wird (allerdings unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nunmehr nur noch ein Homozygotentyp, der dominierende, vorhanden ist), ist dies bei Tetrasomen erst bei einem auf beide Gonentypen wirkenden Letalfaktor und nur unter den Bedingungen der Chromatidenspaltung angenähert der Fall.

Die Tetrasomie ist also, auch unter den schärfsten Selektionsbedingungen, die ersonnen werden können, ein sehr wirksames Mittel zur Aufrechterhaltung der Heterozygotie. Daß hierbei auch die Lage des betreffenden Locus eine Rolle spielt, geht aus den beiden letzten Tabellen eindeutig hervor. Interessant ist es nun, die auf S. 367 bereits besprochene Interaktion zwischen doppelter Reduktion und Selektion erneut zu untersuchen. Hierzu sind die Zahlen der Tabelle (8), in denen sich die Selektionsintensität, bezogen auf den Normalfall, widerspiegelt, hervorragend geeignet. Es wäre nämlich unter der Voraussetzung, daß die doppelte Reduktion ohne Einfluß auf die Selektionswirkung ist, zu erwarten, daß die für die Chromatiden- und Chromosomenspaltung errechneten Quotienten identisch wären. Daß dies nicht der Fall ist, geht bereits aus der Tabelle (8) hervor. Welche Größenordnung nun die durch das Vorkommen der doppelten Reduktion bedingte Verminderung der Selektionswirkung hat, wird deutlich, wenn der Quotient aus den in der Tabelle (8) für Chromatiden- und Chromosomenspaltung gegebenen Zahlen gebildet wird. Dieser Quotient ist für den Fall, daß die rezessiven Zygoten letal sind: $Q = 0.984$, für den Fall, daß die männlichen Gonen rezessiv letal sind: $Q = 0.940$ und daß sowohl männliche als auch weibliche Gonen rezessiv letal sind: $Q = 0.845$. Da ohne Interaktion ein Quotient von 1.0 zu erwarten wäre, bedeutet das, daß die durch die doppelte Reduktion bedingte Verminderung der Selektionswirkung (in Hinblick auf die Erhaltung der Heterozygotie) zum Teil nicht unerheblich und um so stärker ist, je mehr die Selektionsintensität zunimmt.

### 3. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten und die Zusammensetzung von Populationen tetrasomer Selbstbefruchter unter verschiedenen Voraussetzungen mit Hilfe mathematisch-genetischer Methoden untersucht und beschrieben. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Einfluß der nur den Polysomen eigentümlichen doppelten Reduktion gerichtet, der in der Tat nicht

unerheblich ist. So ist das Vorkommen doppelter Reduktion, die als Folge eines Austausches zwischen Locus und Centromer unter der Voraussetzung der Multivalentbildung bedingt, daß in gewissem Umfang auch Geschwisterchromatiden in ein und denselben Gameten gelangen, unter anderem für die folgenden Besonderheiten verantwortlich:

1. Ebenso wie bei fremdbefruchtenden Tetrasomen führt die doppelte Reduktion auch bei Selbstbefruchtern zu einer Verminderung der Heterozygotie. Die Heterozygotenabnahme pro Generation wird von durchschnittlich 0.833 bei Chromosomenspaltung auf 0.786 bei Chromatidenspaltung geändert, d. h. erhöht (Tabelle 2).

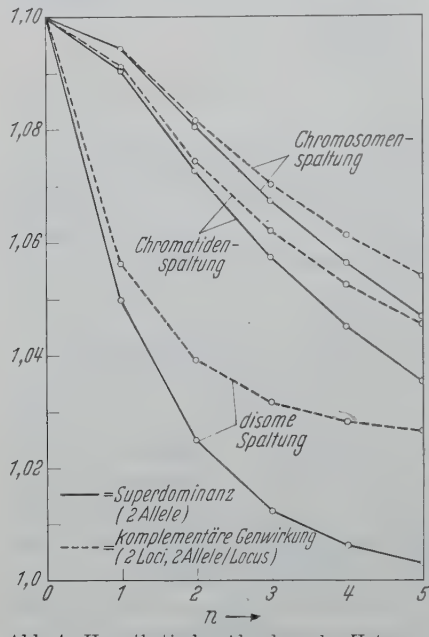



Abb. 4. Hypothetische Abnahme der Heterosisleistung bei di- und tetrasomen Selbstbefruchtern

2. Im Zusammenhang mit der Selektion gegen rezessive Zygoten- und Gonengenotypen zeigt die doppelte Reduktion eine Interaktion in der Weise, daß sie als ein die Selektionswirkung (in Hinblick auf die Erhaltung der Heterozygotie) relativ vermindernder Faktor wirkt (Abb. 2 und S. 367). Das Ausmaß dieser Interaktion hängt von der Selektionsintensität ab, es steigt mit zunehmender Intensität an.

Die doppelte Reduktion erweist sich in allen bisher untersuchten Fällen, unabhängig vom jeweiligen Paarungsmechanismus (s. auch SEYFFERT 1960), als ein die Heterozygotie vermindernder Faktor, wobei diese Tendenz durch die Interaktion mit der Selektion gegen rezessive Zygoten- oder Gonengenotypen, zumindest bei Selbstbefruchtern, noch verstärkt wird.

Eine vergleichende Betrachtung di- und tetrasomer Organismen zeigt, daß einige bemerkenswerte Unterschiede vorhanden sind:

1. Die Heterozygotenabnahme geht bei Tetrasomen sehr viel langsamer als bei Disomen vor sich. Die äquivalente Zahl der Generationen, in der der gleiche Inzuchtgrad erreicht wird, beträgt bei Chromosomenspaltung 5.58 und bei Chromatidenspaltung 4.15 Generationen gegenüber nur 1.44 bei Disomen.

2. Selektion gegen einen homoallelen Zygoten- oder Gonengenotyp bewirkt bei tetrasomem Erbgang eine sehr viel stärkere Erhaltung der Heterozygotie als bei disomem (Abb. 3 und S. 368).

Diese langsame und durch die Selektion noch verzögerte Heterozygotenabnahme läßt die in der Pflanzenzüchtung noch häufig angewandte Methode der Ramschzüchtung, gegen deren Anwendung auch aus anderen Gründen (KAPPERT, unveröffentlicht) Bedenken erhoben werden, für tetrasome Individuen als wenig geeignet erscheinen.

Auf der anderen Seite eröffnet die hohe Heterozygotenhäufigkeit und ihre langsame Verminderung interessante Möglichkeiten, beispielsweise für die Heterosiszüchtung.

Wie Straub (1946) schon nachweisen konnte, tritt bei tetrasomen *Antirrhinum* in den späteren Generationen heterotischer Bastarde ein langsamerer Leistungsabfall als bei vergleichbaren disomen auf. Diese Beobachtung hat uns dazu veranlaßt, die theoretische Abnahme der Heterosisleistung unter Annahme der Superdominanz einerseits (Abb. 4, ausgezogene Linie) und der der komplementären Genwirkung andererseits (gestrichelte Linie) zu errechnen, wobei etwa mögliche Gendosiseffekte nicht berücksichtigt wurden und die Mehrleistung heterozygoter Genotypen mit 10% angesetzt wurde.

Man ersieht aus dieser Abbildung, daß der gleiche Leistungsabfall, der bei Disomen in einer Generation (von der $F_1$ zur $F_2$) zu beobachten ist, bei Tetrasomen erst in rund $3^1/_2$—5 Generationen auftritt. Das bedeutet, daß der Saatguterzeuger vor dem Verkauf von Heterosissaatgut tetrasomer Selbstbefruchter ohne Bedenken noch eine Vermehrungsgeneration einschalten könnte, ohne einen merklichen Leistungsabfall befürchten zu müssen. Auf diese Weise wären die unter Umständen wesentlich höheren Erzeugungskosten des Heterosissaatgutes bei Tetrasomen erheblich zu senken.

**Summary**

The composition of populations of tetrasomic self-fertilizing individuals is investigated. Matrix methods are used in the calculations. Hereby we have particularly in view the influence of the double reduction and the difference between populations of disomics and tetrasomics.

The results are:

1. Double reduction reduces the degree of heterozygosity (Table 2).

2. An interaction exists between double reduction and selection against recessive genotypes. The result of selection with regard to the maintenance of heterozygosis is reduced by double reduction. The extend of interaction depends on the intensity of selection (Fig. 2).

3. Compared with disomics tetrasomics have a very slow decline of heterozygosis (Table 2).

4. Selection against a homoallelic zygotic or gonic genotype by tetrasomic inheritance causes a very much stronger maintenance of heterogosity (Fig. 3).

Herrn Prof. Dr. W. Hoffmann und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Kappert danke ich sehr für anregende Diskussionen.

**Literatur**

Bennett, J. H.: Junctions in inbreeding. Genetica **26**, 392 (1953). — Demarly, Y.: Contribution a l'etude des tetraploides. Ann. Genet. **1**, 25 (1958). — Demerec, M. (Herausg.): Population genetics: the nature and causes of genetic variability in populations. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **20** (1955). — Dobzhansky, Th.: Mendelian populations and their evolution. Amer. Naturalist **84**, 401 (1950). — Fiedler, W.: Erblichkeitsverhältnisse bei einer tetraploiden „immerspaltenden" Levkoje. Züchter **27**, 193 (1957). — Fisher, R. A.: The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press 1930. — The theory of inbreeding. London: Oliver and Boyd 1949. — Statistical methods for research workers. London: Oliver and Boyd 1950. — Fisher, R. A., and K. Mather: The inheritance of style lenght in *Lythrum salicaria*. Ann. Eugen. (Lond.) **12**, 1 (1943). — Ford, E. B.: Mendelism and evolu-

tion. London: Methuen 1957. — Geiringer, H.: Contribution to the heredity theory of multivalents. J. Math. and Phys. **1**, 246 (1948). — Chromatid segregation of the tetraploids and hexaploids. Genetics **34**, 665 (1949). — Haldane, J. B. S.: Theoretical genetics of autopolyploids. J. Genet. **22**, 359 (1930). — The causes of evolution. New York: Harper 1932. — The conflict between inbreeding and selection. I. self-fertilization. J. Genet. **54**, 56 (1956). — Hogben, L.: An introduction to mathematical genetics. New York: Norton 1946. — Huxley, J., A. C. Hardy and E. B. Ford: Evolution as a process. London: Allen and Unwin 1954. — Kalmus, H.: Variation and heredity. London: Routlege and Kegan 1958. — Kappert, H.: Über die Genetik der immerspaltenden Levkojen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **73**, 233 (1937). — Die vererbungswissenschaftlichen Grundlagen der Züchtung. Berlin: Parey 1953. — Die Bestimmung der notwendigen Populationsgrößen bei genetischen und züchterischen Arbeiten. Z. Pflanzenzüchtung **37**, 329 (1957). — Kempthorne, O.: The correlation between relatives in a simple autotetraploid population. Genetics **40**, 168 (1955). — An introduction to genetic statistics. New York: Wiley 1957. — Komai, T., and K. Sakai (Herausg.): Syudan Idengaku (Population genetics). Tokyo: Baifu-Kan 1956. — Lerner, I. M.: Population genetics and animal improvement. Cambridge: University Press 1950. — Genetic homeostasis. London: Oliver and Boyd 1954. — The genetic basis of selection. New York: Wiley 1958. — Li, C. C.: Population genetics. Chicago: University Press 1955. — Little, T. M.: Gene segregation in autotetraploids. I. Bot. Rev. **11**, 60 (1945); II. Bot. Rev. **24**, 318 (1958). — Mather, K.: Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. J. Genet. **30**, 53 (1935). — Segregation and linkage in autotetraploids. J. Genet. **32**, 287 (1936). — The measurement of linkage in heredity. London: Methuen 1951. — Parsons, P. A.: Selfing under conditions favouring heterozygosity. Heredity **11**, 411 (1957). — Equilibria in auto-tetraploids under natural selection for a simplified model of viabilities. Biometrics **15**, 20 (1959). — Seyffert, W.: Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen. I. Die unvollständige Dominanz des El-Faktors von *A. majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 56 (1957). — II. „Superdominanz" bei *Silene armeria*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 231 (1959a). — III. Der Dosiseffekt eines die Methylierung von Anthocyanen kontrollierenden Gens. Naturwiss. **46**, 271 (1959b). — Theoretische Untersuchungen über die Zusammensetzung tetrasomer Populationen. I. Panmixie. Biometrische Z. (1960 im Druck). — Sheppard, P. M.: Natural selection and heredity. London: Hutchinson 1958. — Straub, J.: Die Züchtung von Polyploiden mit positivem Selektionswert. Z. Naturforsch. **1**, 342 (1946). — Wricke, G.: Einige Beispiele für die Anwendungsmöglichkeit der Matrizenrechnung in der Berechnung der Zusammensetzung spaltender Generationen von Selbstbefruchtern. Z. Pflanzenzüchtung **36**, 413 (1956). — Wright, S.: The distribution of gene frequencies in populations of polyploids. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **24**, 372 (1938).

Privatdozent Dr. W. Seyffert, Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung Berlin-Dahlem, Albrecht-Thaer-Weg 6

**Berichtigung**

zur Arbeit W. Seyffert, Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen II. Z. Vererb.-Lehre, Bd. 90, 231—243 (1959):

Statt „Silena armeria L." muß es heißen „Silene armeria L.".

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 375—384 (1959)

Department of Genetics, University of California, Davis, California, USA

# PUTATIVE NON-RECIPROCAL CROSSING OVER IN DROSOPHILA MELANOGASTER

By

M. M. Green

*(Received June 1, 1959)*

One salient feature of crossing over in higher organisms is its reciprocal nature, i. e. the one event produces complementary products. Under ordinary circumstances of symmetrical chromosome pairing, where allelic loci are associated in a two by two manner, complementary crossover products are regularly and unambiguously recovered. Where crossing over is known to occur with the recovery of but one of the expected products (Catcheside 1947; Laughnan 1955; Stadler and Emmerling 1956) the evidence supports the interpretation that crossing over has occurred in association with asymmetrical pairing comparable to that which occurs in individuals homozygous for a tandem duplication. The failure to recover one crossover product can be attributed either to its lethal effects or to its lack of a distinctive phenotype which would permit its separation from either parental type.

It is relevant to emphasize here that extensive studies of pseudoallelism in several organisms have shown that crossing over between pseudoalleles conforms to the usual conditions of symmetrical pairing between alleles. In fact no clearcut case of not strictly homologous pairing such as encountered in homozygous tandem duplications has been described for pseudoallelic loci. This represents one of the more important arguments supporting the contention that pseudoalleles are not duplicate genes but rather discrete gene loci by all conventional attributes.

It is the purpose of this study to report on a case of apparent non-reciprocal crossing over at the *white* locus in *D. melanogaster* and to describe the conditions and presumed mechanisms involved.

## Material and Methods

For convenience the several mutant genes used in this study have been listed in Table 1. Symbols and linkage relations are after Bridges and Brehme (1944). All experiments described were carried out at a temperature controlled between 22—24° C. The conventional corn meal, Brewer's yeast, molasses, agar medium was employed throughout. Where special stocks were used, they will be described in the text.

## Experimental

### *Exceptional progeny derived from* ♀♀ $w^a/w^{a4}$

As part of a program designed to investigate in detail pseudoallelism at the *white* (*w*) eye color locus in *D. melanogaster* the mutants $w^a$ and $w^{a4}$ were studied. The eye color phenotypes associated with each are essentially inseparable but

they can be distinguished by their responses to the *su-w*$^a$. In the presence of *su-w*$^a$ the phenotype of *w*$^a$ is modified toward wild-type while that of *w*$^{a4}$ remains unchanged. Neither mutant suppresses *zeste* and both give recombinants when compounded to *w*$^{ch}$. The distribution of marker genes between these recombinants shows that both *w*$^a$ and *w*$^{a4}$ are localized to the left of *w*$^{ch}$ (Green 1959a).

Table 1. *Synopsis of mutants discussed in text*
[Symbols and linkage data essentially after Bridges and Brehme (1944)]

| Mutant | Symbol | Linkage |
|---|---|---|
| *yellow body color* | *y* | X-0.0 |
| *yellow-2* | *y*$^2$ | allele of *y* |
| *achaete bristles* | *ac* | X-0.0 |
| *scute bristles* | *sc* | X-0.0+ |
| *suppressor of apricot* | *su-w*$^a$ | X-0.05 |
| *zeste eye color* | *z* | X-1± |
| *apricot eye color* | *w*$^1$ | X-1.5 |
| *apricot-3* | *w*$^{a3}$ | allele of *w*$^a$ |
| *apricot-4* | *w*$^{a4}$ | allele of *w*$^a$ |
| *buff* | *w*$^{bf}$ | pseudoallele of *w*$^a$ |
| *cherry* | *w*$^{ch}$ | pseudoallele of *w*$^a$ |
| *spotted-white* | *sp-w* | pseudoallele of *w*$^{ch}$ |
| *split bristles* | *spl* | X-3.0 |
| *Curly wings* | *Cy* | Inversions of II |
| *Ultrabithorax-130 halteres* | *Ubx*$^{130}$ (*Ubx* in text) | Inversions of III |

By way of determining the extent to which the *white* locus could be recombinationally subdivided, ♀♀ of the genotype *y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^a$ *spl*/*w*$^{a4}$; *Cy*/+; *Ubx*/+ were obtained and crossed to ♂♂ *y w spl sn*$^3$. Recombinants in the form of either *w*$^+$ or white-eyed individuals (the latter, on the basis of previous experience, the presumed double mutant class) were sought among the progeny of this cross. As tabulated in Table 2, eight white-eyed individuals (5 ♀♀, 3 ♂♂) all carrying the *spl* marker were found. On progeny testing the ♀♀ produced *y w spl (sn*$^3$*)* and *w spl* ♂♂. These represented the sole exceptions recovered; no *w*$^+$ individuals were found. The cross was repeated using ♀♀ of the genotype *y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^{a4}$ *spl*/*w*$^a$; *Cy*/+; *Ubx*/+ × *y w spl sn*$^3$ ♂♂ and as recorded in Table 2, two white-eyed ♂♂ carrying the *y*$^2$ marker were found. In two subsequent crosses listed in Table 2 where different marker combinations were inserted into *w*$^a$/*w*$^{a4}$ ♀♀ eleven additional white-eyed exceptions were found in association with crossing over. In

Table 2. *Occurrence of white-eyed exceptions from w*$^a$/*w*$^{a4}$ ♀♀ (All ♀♀ heterozygous for *Cy* and *Ubx* inversion and crossed to *y w spl sn*$^3$ ♂♂)

| Genotype parental ♀♀ | White-eyed exceptions | | | | Total progeny |
|---|---|---|---|---|---|
| | *y*$^2$ *spl* | *y*$^2$ | *y*$^1$ | *spl* | |
| *y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^a$ *spl*/*w*$^{a4}$ | | | | 8 | 90,327 |
| *w*$^a$/*y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^{a4}$ *spl* | | 2 | | | 27,705 |
| *sc z w*$^a$ *spl*/*y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^{a4}$ | 6 | | | | 62,252 |
| *w*$^a$/*y w*$^{a4}$ *spl** | | | 5 | | 77,070 |
| *w*$^{a57i}$/*y*$^2$ *su-w*$^a$ *w*$^{a4}$ *spl* | | 1 | | | 93,744 |

* 1 ♂ *y w*$^+$ *spl* recovered.

addition as noted in Table 2, 1 ♂ *y w*$^+$ *spl* was found. This is assumed to represent a back mutation of *w*$^{a4}$ to *w*$^+$, since *w*$^a$ and *w*$^{a4}$ appear to be truly allelic, and since *w*$^+$ occurred in the absence of crossing over. Two conclusions are possible from these results. On the basis of the marker genes distribution in the white-eyed

exceptions, all appear to have arisen by a common crossover event such that for the *y-w$^a$-spl* interval they carry the left segment from the $w^{a4}$ chromosome and the right segment from the $w^a$ chromosome. The recovery of 21 *w* exceptions without finding a single complementary $w^+$ individual suggests that the latter does not occur. Both would be expected if $w^a$ and $w^{a4}$ are pseudoalleles.

Two additional experiments serve to emphasize further the point that conventional crossing over between pseudoallelic mutants is not involved. White-eyed exceptions — to be referred in all subsequent considerations as $w^r$ (white eye derived by recombination) — were recovered in a frequency of about 1/12,000 individuals. If the $w^r$ chromosomes represent $w^a$ and $w^{a4}$ coupled to the same X-chromosome, then from ♀♀ $w^r/+$ both $w^a$ and $w^{a4}$ should be separately recovered at a minimal rate of 1/12.000. Therefore a cross of ♀♀ *y* $w^r$ *spl*/+; *Cy*/+; *Ubx*/+ × *y w spl sn*$^3$ was set up and the progeny classified. Among 76,190 progeny, no exceptions were found.

As pointed out above both $w^a$ and $w^{a4}$ recombine with $w^{ch}$ and are both localized to the left of $w^{ch}$. If $w^r$ represents $w^a$ and $w^{a4}$ coupled to the same chromosome, $w^r$ would nevertheless be expected to recombine with $w^{ch}$. The results of such a test are listed in Table 3 and show that $w^r$ fails to recombine with $w^{ch}$. Only one conclusion appears reasonable from these results: the $w^r$ chromosomes do not represent recombinants between $w^a$ and $w^{a4}$ which couple the mutant genes to the same chromosome.

Table 3. *Test for recombination between $w^r$ and $w^{ch}$ (♀♀ y ac $w^{ch}$ spl/$w^r$; Cy/+; Ubx/+ × ♂♂ y w spl sn$^3$)*

| Source of $w^r$ | Exceptions | Total progeny |
|---|---|---|
| ♀ $y^2$ *su-w$^a$* $w^a$ *spl*/$w^{a4}$ . | 0 | 61,910 |
| ♀ $w^{a\,57\,i}$/$y^2$ *su-w$^a$* $w^{a4}$*spl* | 0 | 79,659 |
| ♀ $w^+$/$y^2$ *su-w$^a$* $w^{a4}$ *spl** | 0 | 50,862 |

* See text for origin of $w^+$ chromosome.

In addition to $w^r$ recombinants obtained from ♀♀ $w^a/w^{a4}$, as noted in Table 2, one $w^r$ was obtained from ♀♀ $w^{a\,57\,i}/w^{a4}$. The mutant $w^{a\,57\,i}$ is a spontaneous back-mutation of $w^a$ to a near $w^-$ phenotype which was found as a single ♂ in a $y^2$ *su-w$^a$* $w^a$ *spl* stock. It will be noted that the $w^r$ obtained carried the $y^2$ marker precisely as occurred in a parallel cross where $w^a$ had been used. A test for recombination between $w^r$ derived from $w^{a\,57\,i}/w^{a4}$ and $w^{ch}$ gave, as tabulated in Table 3, negative results.

### *Cytogenetic nature of the $w^r$ mutations*

The foregoing genetic information favors the argument that a minute structural change is associated with the $w^r$ recombinants. On the basis of two genetic tests $w^r$ can be localized to the salivary gland chromosome doublet 3C2,3. In the first of these tests, $w^r$ chromosomes from the several crosses listed in Table 2 were tested for coverage by two duplications of the *w* locus, *Dp* $w^{+\,51\,b\,7}$ and *Dp* $w^{+\,51\,c\,20}$ (Ratty 1954). Both are known to cover all known *w* loci and were found to cover a deficiency for bands 3C2,3 but not one for band 3C1 (Green 1959b). Both duplications cover the $w^r$ chromosomes, i. e. ♂♂ of the genotype $w^r$/*Dp* $w^+$ are wild-type in eye color. The second test consisted in determining whether $w^r$ was or was not a suppressor of the mutant *zeste*. It is known that ♀♀ *z* $w^+/z$ *w* deficiency (where the deficiency lacks band 3C1) are wild-type in phenotype (Gans 1953, Green 1959b). This is to say that a deficiency for band

3C1 inhibits the phenotypic manifestation of *zeste*. For a comparable test, ♀♀ of the genotype $z\ w^+/z\ w^r$ were obtained and proved to be *zeste* in eye color. These results mean that whatever the structural change associated with $w^r$, it does not include the loss of band 3C1 but must be delimited at a minimum to the doublet 3C2,3.

Further indirect evidence that a structural change is associated with $w^r$ chromosomes was suggested from determinations of the crossing over frequencies for the interval $y^2$-$w^a$-*spl*. In each case ♀♀ were heterozygous for the autosomal inversions *Cy* and *Ubx*. For purposes of comparison crossing over was measured for the interval $y^2$-$w^a$-*spl* when compounded with a deficiency for band 3C1, $w^{258-45}$, and the mutant $w^{a3}$, an allele of $w^a$. The results tabulated in Table 4 show that both $w^{258-45}$ and $w^r$ effect a marked reduction in crossing over for the interval $y^2$-$w^a$ and less striking though nonetheless appreciable reduction in crossing over in the interval $w^a$-*spl*. These observations are comparable to those of Stadler and Roman (1948) who found that cytologically undetectable *A* losses in maize reduce crossing over in their genetic environs. On the assumption that the decrease in crossing over is a function of the magnitude of the associated loss a working hypothesis was adopted tentatively which states that $w^r$ is associated with a chromosome loss smaller than that of $w^{258-45}$ and presumably less than one entire band.

Table 4. *Crossing over in the $y^2$-$w^a$-spl interval* (All ♀♀ heterozygous for *Cy* and *Ubx* inversions)

| Genotype parental ♀♀ | Crossing over % for interval | | Total progeny classified |
|---|---|---|---|
| | $y^2$-$w^a$ | $w^a$-*spl* | |
| $y^2\ su\text{-}w^a\ w^a\ spl/w^{a3}$ . . | 7.4 | 2.7 | 2464 |
| $y^2\ su\text{-}w^a\ w^a\ spl/w^r$ . . | 3.6 | 1.9 | 2999 |
| $y^2\ su\text{-}w^a\ w^a\ spl/y\ w^{258-45}$ | 1.7 | 1.1 | 3975 |

Any hypothesis which associates $w^r$ with a chromosome loss whether such a loss is minute or not encounters a number of difficulties. The general rule in Drosophila is that homozygous and hemizygous chromosome losses are lethal. To this rule the following exceptions have been unequivocally demonstrated: losses for the sex-linked loci of *y*, *ac* (Muller 1935) and *rst*[2] (Emmens 1937, Slizynska 1938) are ♂ viable. Presumably $w^r$ belongs to this category of deficiencies. What criteria can be used to convincingly demonstrate the deficiency nature of $w^r$? The obvious first approach is cytological. Since $w^r$ has been delimited to the salivary chromosome doublet 3C2,3 a careful cytological examination was undertaken. For this study the author is indebted to the painstaking efforts of Dr. H. Becker. The cytology of $w^r$ proved to be wholly negative and insofar as could be seen the doublet 3C2,3 is visibly unaltered in $w^r$ chromosomes. While such negative results are at best disappointing, there is ample precedence to indicate that negative cytological results in themselves are not decisive. For maize, the experience of Stadler and Roman (1948) provides ample evidence to support this contention. Of obvious interest here is Panshin's (1938) claim of having obtained a ♂ viable *w* deficiency by combining chromosomes from two independent *white-mottled* rearrangements. Cytologically the presumed *w* deficiency showed no change at the *w* locus-bands 3C2, 3. Clearly cytological findings are insufficient and other independent criteria must be submitted before a firm conclusion can be reached.

One such criterion was developed which, as will be shown, appears to be, if anything, more reliable and more readily applied than cytology in demonstrating deficiencies at the white locus. Among the four recombinationally defined *white* loci, the rightmost or *spotted-white (sp-w)* locus has unique phenotypic properties. Three alleles are known at this locus (Lewis 1956, Green unpublished) and all behave identically. All *sp-w* mutants when compounded with *w* mutants of the other three loci yield a complementary phenotype. For example, at each of the three loci localized to the left of *sp-w*, mutants producing indistinguishable white-eyed phenotypes are known. When compounded *inter se*, the phenotypes are white but when each is compounded to any of the three *sp-w* mutants the resultant eye color phenotype is deep brown, clearly darker than that of any of the mutants. Comparable complementary phenotypes are produced when mutants of the three loci whose eye color contains more or less eye pigments are compounded to each *sp-w*. These unusual phenotypic interactions suggested that compounds of *sp-w* and known *white* deficiencies be made to see how the deficiencies behaved. Four *white* deficiencies were selected for study: $w^{258-45}$ deficient for band 3C1, $w^{258-11}$ lacking bands 3A1 to 3C4 inclusive, $w^{258-48}$ lacking bands 3B1 to 3C1 inclusive and a deficiency for the doublet 3C2,3 derived by crossing over between *In(1)* $w^{m4}$ and *In(1)* $rst^3$. All deficiencies produced identical phenotypes when compounded to *sp-w*. The eye phenotypes of these females were inseparable from those of homozygous *sp-w* females and no indication of a complementary phenotype was observed.

These observations demanded that representative $w^r$ chromosomes be tested to *sp-w*. When ♀♀ $w^r$/*sp-w* were obtained, all proved to be *sp-w* in phenotype inseparable from homozygous *sp-w* ♀♀ or from ♀♀ compounded of *sp-w* and known *white* deficiencies. Clearly, these findings mean that despite the failure to demonstrate a cytological loss and despite the ♂ viability of $w^r$, some cytologically undetectable part of the doublet 3C2,3 is absent in $w^r$ chromosomes.

The objectivity and reliability of the *sp-w* phenotypic test for detecting losses at the *white* locus was bolstered by an independent series of experiments. For quite another purpose X-ray induced mutations were sought at the *white* locus. In design wild-type ♂♂ were irradiated and crossed to ♀♀ homozygous $y^2\ w^a\ v\ f$ localized within the double inversion complex of *In(1) sc*$^8$ and *In(1) dl 49*. All $F_1$ ♀♀ manifesting a phenotype characteristic of $w^a/w$ heterozygotes were progeny tested by crossing to $y^2\ w^a\ v\ f$ ♂ sibs. Two types of $F_1$ ♀♀ were found: those producing both $y^2\ w^a\ v\ f$ and *w* ♂♂ and those producing only $y^2\ w^a\ v\ f$ ♂♂. Presumably the latter descended from ♀♀ heterozygous for $y^2\ w^a\ v\ f$ and an induced *white* deficiency. From cultures of the latter, ♀♀ heterozygous for $y^2\ w^a\ v\ f$ and the presumptive deficiency were crossed to $sp^2$-*w* ♂♂. Among 12 cultures tested, two distinct results were obtained. In each of four cultures all ♀ progeny manifested the complementary eye color characteristic of *sp-w/w* mutant heterozygotes. In the remaining eight cultures the ♀ progeny consisted of two types: those with a complementary phenotype and those with a *sp-w* phenotype. These results were interpreted as follows. Those cultures in which both complementary and *sp-w* ♀♀ occurred are heterozygous for genuine deficiencies induced at the *w* locus. On the other hand those cultures in which only ♀♀

with a complementary phenotype occurred are heterozygous for a chromosome carrying both an induced *w* mutant and a simultaneously induced recessive sex-linked lethal. The latter produces the observed ♂ lethality. That this explanation was correct was proved by subsequent crosses in which a ♂ viable *w* mutant free of a sex-linked lethal mutation was extracted from each culture. An appropriate group of each presumed deficiency was tested further with known duplications and deficiencies of the *white* locus and it was conclusively established that each was associated with a loss at the *w* locus.

These experiments provide an objective, independent test showing that the phenotypic interaction with *sp-w* represents a sensitive, reliable method for detecting deficiencies at the *white* locus and thereby establishes the credibility of the conclusion that the $w^r$ chromosomes owe their phenotypes to a minute loss involving in all probability the 3C3, 2 doublet.

Before attempting to explain the mode of origin of the $w^r$ losses, one pertinent question requires answering. Is the origin of $w^r$ from $w^a/w^{a4}$ ♀♀ a specific attribute of the mutants $w^a$ and $w^{a4}$ or are other tightly linked genetic factors involved and the presence of $w^a$ and $w^{a4}$ is simply fortuitous ? By way of testing these alternatives, the following facts were taken into consideration. If $w^a$ and $a^{a4}$ are not themselves involved, the responsible genetic factors are linked either to the immediate left or right of each mutant. Such factors, if they exist, can be localized according to the following scheme. As demonstrated by the recombination test, both $w^a$ and $w^{a4}$ occupy loci to the left of $w^{ch}$. If the genetic factors producing $w^r$ chromosomes occupy loci to the right of $w^a$ (i. e. allelic to $w^{ch}$ or *sp-w*), they should be included in the wild-type recombinant obtained through crossing over between $w^a$ and $w^{ch}$. On testing these wild-type recombinants to $w^{a4}$, $w^r$ chromosomes should be recovered in association with crossing over precisely as was the case for $w^a/w^{a4}$ ♀♀. If these factors yielding $w^r$ are either inherent in $w^a$ or localized to the left of $w^a$, no exceptions should be recovered when testing to $w^{a4}$. Contrariwise if the genetic factors associated with the origin of $w^r$ are localized to the right of $w^{a4}$, they should be included in the wild-type recombinant obtained through crossing over between $w^{a4}$ and $w^{ch}$. On testing the wild-type recombinant to $w^a$, $w^r$ exceptions associated with crossing over should be recovered. Negative results from such a test mean either that the $w^r$ forming property is inherent in $w^{a4}$ or is localized to the left of $w^{a4}$.

Accordingly wild-type chromosomes derived from crossing over between $w^a$ and $w^{ch}$ as well as between $w^{a4}$ and $w^{ch}$ were obtained and tested to $w^{a4}$ and $w^a$ respectively for $w^r$ recombinants. The results of these tests are given in Table 5. These tests show that $w^r$ exceptions were obtained from the $w^+$ derived from $w^a/w^{ch}$ but none were obtained where the $w^+$ derived from $w^{a4}/w^{ch}$ was tested. It should be noted that the $w^r$ chromosomes recovered carried those marker genes expected if $w^a$ had been used. Furthermore, genetic tests employed as outlined above proved these $w^r$ recombinants to be identical to $w^r$ recombinants coming from $w^{a4}/w^a$ ♀♀. For example as listed in Table 3, a test for recombination between $w^r$ and $w^{ch}$ proved to be negative. These results demonstrate that the $w^a$ mutant itself is not causally associated with the origin of the $w^r$ recombinants but rather genetic factors localized to either or both the $w^{ch}$ and *sp-w* loci are involved. Further evidence that recovery of the $w^r$ exceptions must be causally associated

to the source of the $w^+$ chromosome is substantiated by the following test. Progeny of ♀♀ $y^2$ *su-w*$^a$ $w^{a4}$ *spl*/$w^+$ where the $w^+$ came from the Canton-S wild-type stock were scored and $w^r$ exceptions sought. The results listed in Table 5 show that none were found.

Table 5. *Occurrence of* $w^r$ *exceptions through crossing over with derived* $w^+$ *chromosomes* (All ♀♀ heterozygous for *Cy* and *Ubx* inversions and crossed to *y w spl sn*$^3$ ♂♂)

| Source of $w^+$ | Genotype parental ♀♀ | $w^r$ Exceptions | | Total progeny |
|---|---|---|---|---|
| | | $y^2$ | *spl* | |
| $w^{a4}/w^{ch}$ . . | *y* $w^+/y^2$ *su-w*$^a$ $w^a$ *spl* | 0 | 0 | 79,000 |
| $w^a/w^{ch}$ . . | *y* $w^+/y^2$ *su-w*$^a$ $w^{a4}$ *spl* | 5 | 0 | 55,083 |
| $w^a/w^{bf}$ . . | $y^2$ $w^+/y^2$ *su-w*$^a$ $w^{a4}$ *spl* | 0 | 0 | 63,930 |
| back mutation of $w^{a4}$ | $y^1$ $w^+$ *spl*/$w^a$ | 0 | 0 | 79,430 |
| Canton-S + | $w^+/y^2$ *su-w*$^a$ $w^a$ *spl* | 0 | 0 | 56,290 |

An additional check of the $w^a$ mutant was made using a wild-type recombinant between $w^{bf}$ and $w^a$. Since $w^{bf}$ is localized to the left of $w^a$, the $w^+$ carries the left segment of the $w^a$ chromosome and the right segement of the $w^{bf}$ chromosome. This $w^+$ on being tested to $w^{a4}$ gave, as noted in Table 5, no $w^r$ recombinants. This result is expected if the genetic factors conditioning the $w^r$ recombinants lie to the right of $w^a$.

A further check on the mutant $w^{a4}$ was made by using the presumed back mutation of $w^{a4}$ which arose as a single *y* $w^+$ *spl* ♂ among the progeny of *y* $w^{a4}$ *spl*/$w^a$ ♀♀. The *y* $w^+$ *spl* chromosome was tested to $w^a$ and as indicated in Table 5 no $w^r$ recombinants were recovered. Assuming that this $w^+$ arose as a *bona fide* back mutation of $w^{a4}$, it can be concluded that $w^{a4}$ itself is necessary for the formation of the $w^r$ recombinants.

Mention should be made at this point of one experiment designed to detect the recombinant reciprocal to $w^r$. For this purpose attached-X ♀♀ were used in which one X chromosome carried the mutants $y^2$ *sc* $w^a$ *ec* and the homologous X carried $y^2$ *su-w*$^a$ $w^{a4}$ *spl*. These ♀♀ were made heterozygous for the autosomal inversions *Cy* and *Ubx* and subsequently crossed to $y^2$ *sc* $w^a$ *ec* ♂♂. If a reciprocal crossover occurs to produce the $w^r$ type, the homologous X chromosome should carry the complementary crossover type. Exceptions were sought among the female progeny assuming that their phenotype would be equivalent to that of ♀♀ *w*/$w^a$ or $w^{a4}$. Among 35,100 female progeny 5 presumptive exceptions were tested. None proved to carry a $w^r$ recombinant and this experiment was unsuccessful.

## Discussion

The results of the foregoing genetic analysis are compatible with the interpretation that the $w^r$ recombinants are associated with a minute chromosome loss, a loss included within a cytologically undetectable part of bands 3C2 and 3 of the salivary gland X chromosome. A loss interpretation readily explains the failure of $w^r$ to recombine with $w^{ch}$ despite the fact that $w^a$ and $w^{a4}$, from which $w^r$ arose, do recombine. Furthermore, the idea of a loss readily explains why neither $w^a$ nor $w^{a4}$ could be recovered from $w^r$.

What mechanism can be invoked to account for the occurrence of $w^r$ losses? By analogy with the pairing associations and crossing over experienced in homozygous tandem duplications, a reasonable solution can be made. However, a number of genetic facts relevant to the nature of the *white* locus must be evaluated before an interpretation can be considered. Based upon data derived from the cytogenetic behavior of duplications and deficiencies, the *white* locus has been localized to salivary chromosome bands 3C1,2 and 3 with *w* mutants delimited to bands 3C2 and 3 (Green 1959b). A recombination analysis among 36 *w* mutants shows that, in reality, four recombinationally discrete loci are involved (Green 1959a). It is, therefore, not unreasonable to postulate the association of two of the *w* loci to band 3C2 and two to band 3C3. Specifically, this means for the four loci, represented linearly by the mutants $w^{col}$, $w^a$, $w^{ch}$, and *sp-w*, that $w^{col}$ and $w^a$ are localized to band 3C2 and $w^{ch}$ and *sp-w* to band 3C3. For convenience each band may be further subdivided into two parts, 2 and 2′, 3 and 3′, where each part corresponds to one of the four mutant loci. Within this organizational scheme in a $w^a$ carrying X chromosome, region 2 carries the normal allele of $w^{col}$, region 2′ the mutant $w^a$, region 3 the normal allele of $w^{ch}$ and region 3′ the normal allele of *sp-w*. A parallel situation follows for the $w^{a4}$ chromosome where $w^{a4}$ is localized to region 2′.

Under the usual circumstances of strictly homologous pairing between allelic loci, the occurrence of crossing over results in two products of equal genetic length. However, in the case of homozygous tandem duplications where asymmetrical or non-homologous pairing often occurs, the occurrence of a crossover within the asymmetrically paired segment will result in two products which differ genetically from the parental chromosomes. One chromosome will be deficient, the other triplicated in relation to the duplication of the parental chromosome.

By inferring the occurrence of a comparable pairing and crossing over situation between the $w^a$ and $w^{a4}$ chromosomes, the manner by which the $w^r$ loss arises can be readily explained. For simplicity, the component salivary gland chromosome bands of the *w* region of the chromosome will be designated as 1, 2, 2′, 3 and 3′ with $w^a$ and $w^{a4}$ localized to 2′. A number of different asymmetrical schemes can be devised all of which will yield as a consequence of crossing over a deficiency and a duplication for this region.

However, the following scheme which takes into consideration all the available genetic data appears to fit best. The first diagrammatic chromosome represented below marked with the mutants *y* and *spl* carries $w^a$, while the homologue carries $w^{a4}$. Since it is the region to the right of $w^a$, presumably 3 and 3′ which promotes in part the formation of $w^r$, it is assumed that region 3 of the $w^a$ chromosome pairs with $w^{a4}$ or 2′ of the homologous chromosomes. Such a pairing scheme is diagrammatically represented as follows:

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *y* | 1 | 2 | 2′ | 3 | 3′ | | *spl* |
| | | 1 | 2 | 2′ | 3 | 3′ | |

If a crossover occurs simultaneously between 2 and 2′ of the $w^a$ chromosome and 1 and 2 of the $w^{a4}$ chromosome, the resultant crossover chromosomes will be: (1) 1 2′ 3 3′ *spl* or a chromosome deficient for 2, and (2) *y* 1 2 2 2′ 3 3′, a chromosome duplicated for 2. The deficient chromosome carrying the *spl* marker would

be expected to be white-eyed since *w*-eyed mutants allelic to $w^{col}$ are known (GREEN 1959a). The reciprocal, a duplication of 2, would also carry the $w^{a4}$ mutant and would be expected, on the interpretation that the recombinationally discrete loci are also functionally discrete, to be $w^{a4}$ in phenotype and thus phenotypically undetectable in the experiments reported here.

Another possible source of a $w^r$ loss as a result of crossing over within the paired region diagrammed above follows the occurrence of a simultaneous crossover in between 2′ and 3 of the $w^a$ chromosome and 2 and 2′ of the $w^{a4}$ chromosome. One crossover product carrying the *spl* marker would include 1 2 3 and 3′ or would be deficient for 2′ and consequently white-eyed in phenotype. The reciprocal, a duplication carrying the *y* marker, would be represented as 1 2 2′ 2′ 3 and 3′ and would carry both $w^a$ and $w^{a4}$. The phenotype of the latter is not immediately obvious. It is known that in a tandem duplication where the whole *w* region is duplicated, where $w^a$ is included in one segment and $w^{a4}$ in the adjacent segment, that $w^a$ and $w^{a4}$ behave phenotypically as hypomorphs. Consequently the resultant phenotype associated with this tandem duplication is distinctly more normal than that of either $w^a$ or $w^{a4}$ (GREEN unpublished). Conceivably a duplication of 2′ carrying both $w^a$ and $w^{a4}$ could be darker than either mutant. If this were true, the duplication could hardly escape detection in a number of the experiments reported here. The failure to detect individuals of this phenotype means that either the duplication does not occur or phenotypically it does not manifest the phenotype suggested.

In brief, a deficiency for either 2 or 2′ is sufficient to represent $w^r$. Either deficiency would fail to recombine with $w^{ch}$, and either would fail to suppress *z*, as do all the mutants localized to 2 or 2′ (GREEN 1959a). Cytologically such deficiencies might very well escape detection.

It is relevant at this juncture to point out that the mode of occurrence and nature of $w^r$ losses serve to explain the occurrence of other exceptions reported to occur in association with crossing over between *w* mutants by MACKENDRICK (1953) and JUDD (1957). MACKENDRICK found among the progeny of ♀♀ $w^{bl}/sc\ w^{aE}\ ec$ the following exceptions: *sc w*, *w ec* and *sc* $w^+$ individuals. The *w ec* and *sc* $w^+$ individuals represent the products of crossing over between the pseudoalleles $w^{bl}$ and $w^{aE}$. The *sc w* individuals could represent exceptions equivalent to $w^r$, presumably arising in a similar manner. Significantly this situation parallels precisely the recovery of $w^r$ exceptions in that no reciprocals to *sc w* were found. This interpretation obviates PONTECORVO's (1958) explanation for the occurrence of the *sc w* exception based on the idea that $w^{aE}$ is in fact a *w* mutant coupled with a tightly linked partial suppressor. There are a number of reasons for seriously doubting the plausibility of this interpretation. Chief among these is the fact that the *sc w* exception came from only two types of ♀♀, $w^{aE}/w^{bl}$ and $w^{aE}/w^+$, even though $w^{aE}$ appears to have been widely used as a tester for recombination. Occurrence of exceptions from ♀♀ $w^{aE}/w^+$ is not unlike the recovery of $w^r$ exceptions from ♀♀ $w^{a4}/w^+$ where $w^+$ arose through crossing over between $w^a$ and $w^{ch}$. JUDD obtained similar results among the progeny of ♀♀ $w^{bf}/y^2\ w^a\ spl$. Three exceptional types were found: $y^2\ w$, *w spl* and $y^2\ w^+$ individuals. The $y^2\ w^+$ and *w spl* individuals are products of crossing over between the pseudoalleles $w^{bf}$ and $w^a$, while the $y^2\ w$ individuals are here interpreted as equivalent to $w^r$. Again

the parallel with the occurrence of $w^r$ such that no reciprocals to the $y^2$ $w$ exceptions were found.

One question defies explanation at this time. Why do the $w^r$ exceptions occur among the progeny of $w^a/w^{a4}$ ♀♀? If the interpretation offered above, viz. that $w^r$ is the consequence of non-two by two pairing, is the correct one, the origin of $w^r$ exceptions will be resolved only when the problem of what conditions bring about symmetrical pairing and what conditions induce asymmetrical pairing is thoroughly understood. The forces which are involved in inducing chromosome pairing are admittedly poorly understood at best, and the experimental results reported here shed no further light in clarifying this fundamental problem.

## Summary

1. From ♀♀ heterozygous for the mutants $w^a/w^{a4}$ white-eyed progeny are recovered in association with crossing over. On the basis of the marker gene distribution to the white-eyed exceptions, the left segment of their $w$ locus comes from the $w^{a4}$ chromosome, the right segment from the $w^a$ chromosome.

2. No exceptions reciprocal to the white-eyed exceptions were found.

3. Evidence is presented which demonstrates that the white-eyed exceptions are associated with a cytologically undetectable loss.

4. The occurrence of the white-eyed exceptions is dependent not on the $w^a$ mutant but rather on tightly linked factors to the right of $w^a$.

5. It is suggested that the white-eyed exceptions occur as a consequence of crossing over within not strictly homologously paired component segments of the *white* region of the chromosome.

## Literature

Bridges, C. B., and K. C. Brehme: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington Publ. No 552, 257 (1944). — Catcheside, D. G.: A duplication and deficiency in Oenothera. J. Genet. **49**, 99 (1947). — Emmens, C. W.: Salivary gland cytology of *roughest*$^3$ inversion and reinversion, and *roughest*$^2$. J. Genet. **34**, 191 (1937). — Gans, M.: Étude génétique et physiologique du mutant *z* de *Drosophila melanogaster*. Bull. Biol. France Belg. Suppl. **38**, 1 (1953). — Green, M. M.: Spatial and functional properties of pseudoalleles at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. Heredity (1959a in press). — Nonhomologous pairing and crossing over in *Drosophila melanogatser*. Genetics (1959b in press). — Judd, B. H.: Complex pseudoallelism at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. Rec. Genet. Soc. Amer. **26**, 379 (1957). — Laughnan, J. R.: Structural and functional bases for the action of *A* alleles in maize. Amer. Naturalist **89**, 91 (1955). — MacKendrick, M. E.: Further examples of crossing over between alleles of the *w* series. Dros. Inf. Serov. **27**, 100 (1953). Muller, H. J.: A viable two-gene deficiency phenotypically resembling the corresponding hypomorphic mutation. J. Hered. **26**, 469 (1935). — Panshin, I. B.: A viable homozygous deficiency in *Drosophila melanogaster*. Nature (Lond.) **142**, 837 (1938). — Pontecorvo, G.: Trends in genetic analysis, p. 145. New York: Columbia University Press 1958. — Ratty, F. J.: Gene action and position effects in duplications in *Drosophila melanogaster*. Genetics **39**, 513 (1954). — Slizynska, H.: Salivary chromosome analysis of the white-facet region of *Drosophila melanogaster*. Genetics **23**, 291 (1938). — Stadler, L. J., and M. H. Emmerling: Relation of unequel crossing over to the interdependence of $R^r$ elements (P) and (S). Genetics **41**, 124 (1956). — Stadler, L. J., and H. Roman: The effect of X-rays upon mutation of the gene *A* in maize. Genetics **33**, 273 (1948).

Professor M. M. Green,
Department of Genetics, University of California, Davis/California, USA

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 385—392 (1959)

From the Indian Agricultural Research Institute, New Delhi (Director: Dr. B. P. Pal)

# MULTIVALENT FREQUENCY AND SEED FERTILITY IN RAW AND EVOLVED TETRAPLOIDS OF BRASSICA CAMPESTRIS VAR. TORIA

By

M. S. Swaminathan and K. Sulbha

With 9 Figures in the Text

*(Received August 5, 1959)*

The extent of multivalent formation has been studied in induced autopolyploids of various plant species by many authors primarily to find out whether in such plants the frequency of occurrence of multivalents is in any way correlated with the extent of seed fertility. The formation of multivalents resulting in the production of gametes with aneuploid chromosome numbers was considered by Darlington (1937) to be the primary cause for the reduced fertility of autopolyploids. However, the data obtained by several workers during the last 20 years have failed to reveal any consistent relationship between multivalent frequency and seed sterility and it is now clear that fertility in auto- as well as allo-polyploids is influenced not only by the presence or absence of multivalents but also by other kinds of genic control (Müntzing 1956). Thus, plants with a high frequency of quadrivalents may be perfectly fertile and plants with a regular bivalent formation highly sterile. In many of the induced polyploids selection for fertility has been possible and by providing an artificial evolution to the raw polyploids, several strains of commercial value have been produced in crops like rye and clovers. Such evolved autopolyploids provide good material for studying the effect of selection for agronomically valuable characters on meiotic behaviour. In maize, Gilles and Randolph (1951) have studied meiosis in a tetraploid strain at the beginning and end of a ten year period. They found that there were fewer quadrivalents and more bivalents at the end of the period than at the beginning. Similar data concerning the frequency of aneuploid aberrants have been obtained by Hagberg (1953) in rye. Hilpert (1957) observed that selection for seed fertility as well as for tillering during three generations in autotetraploid rye resulted in a significant increase in meiotic regularity.

Polyploidy was induced in *Brassica campestris* L. var. *toria* Duth. & Full. ($2n = 20$) in 1941 at the Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, by Ramanujam and Deshmukh (1945). The average seed fertility in the raw autotetraploids was found to be 2.7 seeds per siliqua, the corresponding average figure for the diploids being 13.8 seeds. Straight selection for fertility led to some improvement, but a static condition was reached as regards improvement in seed fertility after seven generations of selection and controlled cross-pollinations among plants with good fertility. At this stage, a revised selection procedure similar to the "Mass Pedigree System" of Harland (1949) was applied by Parthasarathy and Rajan (1953). The effectiveness of this method which

essentially consisted in the isolation of the elite population and bulking of the seeds of the selected plants before sowing, was seen after two generations when the frequency of plants in the higher fertility classes showed a rise and the modal classes of the tetraploids shifted to the same class as in the diploid population. The trend of improvement in fertility in the autotetraploid *Toria* was maintained during subsequent generations (Rajan 1955). Parthasarathy and Rajan (1953) concluded that the highly cross-fertilized nature of *Toria* and the operation of self incompatibility alleles govern to a large extent the fertility of the tetraploid population and that the revised breeding method adopted by them has brought about favourable gene combinations resulting in increased fertility.

In view of the strikingly high seed fertility of the tetraploid *Toria* strains developed by Parthasarathy and Rajan (1953), we studied the types of chromosome associations found during meiosis in microsporocytes in plants belonging to the $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations grown during 1956, 1957 and 1958 respectively. We produced in 1956 by colchicine treatment tetraploids of strain 22, which had been used originally by Ramanujam and Deshmukh (1945) for chromosome doubling and studied the frequency of occurrence of multivalents in the raw tetraploid plants also. The data are presented and discussed in this paper.

## Material and Methods

Autotetraploids of strain 22 of *Toria* belonging to the $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations were used in this study. To produce again tetraploids of strain 22, seedlings were treated in 1956 with colchicine by the following method. A small quantity of cotton was dipped in a mixture of equal parts of 0.4% aqueous solution of colchicine and glycerine and placed on the growing points of 2 to 3 inch high seedlings. Drops of the colchicine-glycerine solution were applied on the cotton plug at frequent intervals and the treatment lasted for 36 hours. At the end of the treatment, the growing points of the seedlings were washed in water. Three tetraploid seedlings were obtained in this way and plants belonging to both $C_1$ and $C_2$ generations were cytologically examined.

Meiosis was studied in PMC squashes. Anthers were fixed in Carnoy's mixture (6 parts absolute alcohol, 3 parts chloroform and 1 part glacial acetic acid) for 24 hours. They were then transferred to propionic-alcohol (1:3). The propionic acid component of the fixative contained a saturated solution of ferric acetate (Swaminathan et al. 1954). The anthers were squashed 24 hours later in a drop of propiono-carmine. Since the cytoplasm also tended to get stained, a drop of 45% acetic acid was added to a drop of the stain while squashing. This led to a clear differentiation and as can be seen from the microphotographs, the preparations were suitable for critical analysis. Fixations were done from $C_1$ and $C_{17}$ plants during 1956, from $C_2$ and $C_{18}$ plants during 1957 and from $C_{19}$ plants during 1958. In every case, the material was fixed on the same date and at the same time and only clear diakinesis and early metaphase plates were analysed. Since no significant inter-plant differences in the frequency of multivalent associations were observed in the different generations, the detailed study was confined to one plant of each generation.

Seed fertility was calculated in the tetraploid plants used in cytological studies by taking the average of 10 siliquae from the middle of the main stem.

## Experimental Results

**Multivalent Frequency.** The different types of chromosome associations found at diakinesis and metaphase I were scored and the data are given in Table 1. The number of cells with different frequencies of multivalents (quadrivalents + trivalents) found in the different generations is given in Table 2. Associations

higher than quadrivalents were not observed and the maximum number of quadrivalents observed in a cell was 8 (Figs. 4 and 5). Two such cells were found in a plant belonging to the $C_2$ generation. The types of quadrivalents observed

Table 1. *Chromosome associations and chiasma frequency in tetraploid Toria*

| Generation | No. of cells studied | Frequency per cell | | | | | | | | Mean No. of Xta per cell |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | quadrivalents | | trivalents | | bivalents | | univalents | | |
| | | range | mean | range | mean | range | mean | range | mean | |
| $C_1$ | 40 | 2—7 | 3.95 | 0—1 | 0.15 | 6—16 | 11.675 | 0—2 | 0.40 | 36.2 |
| $C_2$ | 41 | 1—8 | 3.41 | 0—3 | 0.73 | 5—16 | 11.50 | 0—3 | 1.17 | 36.8 |
| $C_{17}$ | 80 | 0—5 | 2.08 | 0—3 | 0.44 | 8—20 | 14.86 | 0—5 | 0.64 | 36.6 |
| $C_{18}$ | 40 | 0—6 | 2.00 | 0—2 | 0.55 | 7—20 | 14.70 | 0—3 | 0.95 | 36.7 |
| $C_{19}$ | 50 | 0—5 | 1.68 | 0—4 | 0.74 | 9—20 | 14.98 | 0—4 | 1.10 | 36.4 |

Table 2. *Frequency of multivalents in Toria tetraploids*

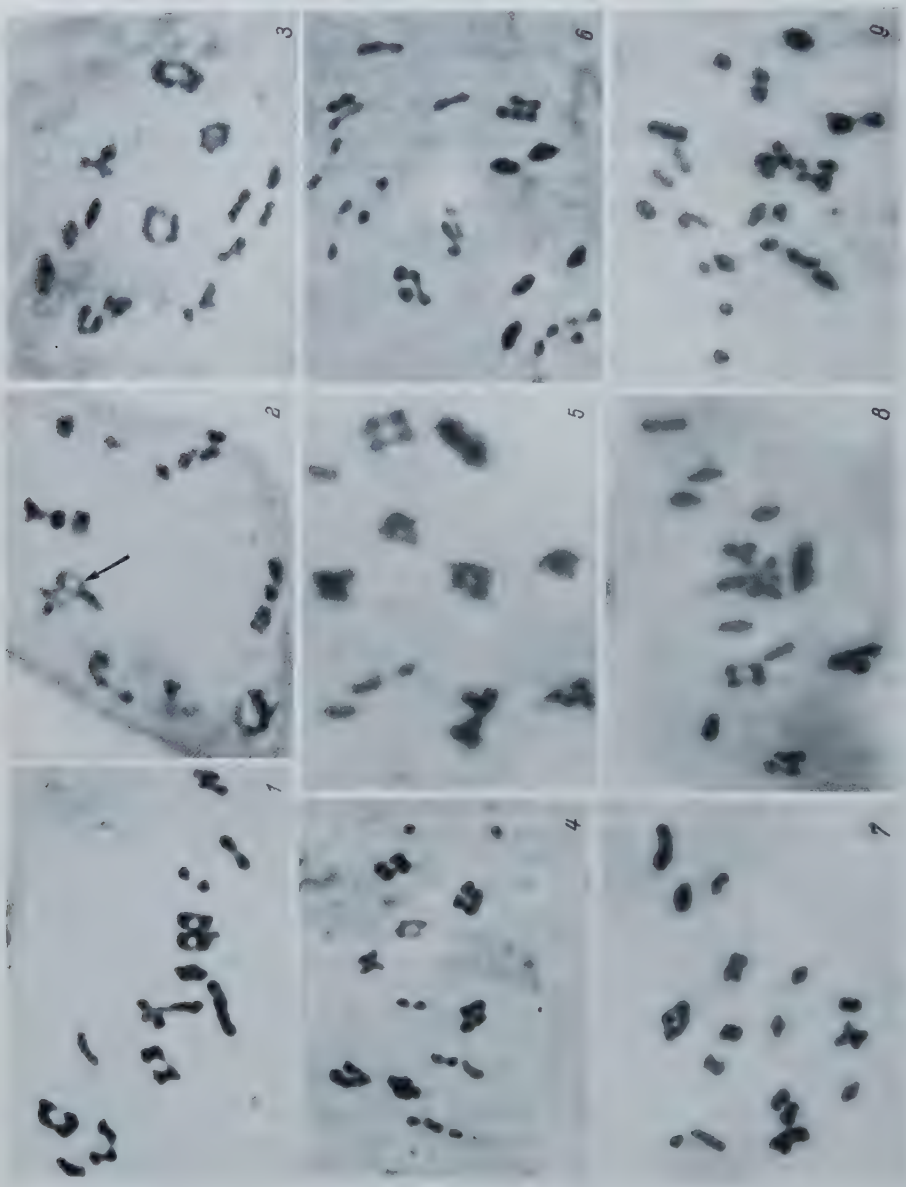
| Generation | No. of cells with a multivalent frequency of | | | | | | | | | Mean No. of multivalent per cell ± S. E. | Coefficient of realization |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | |
| $C_1$ | 0 | 0 | 4 | 5 | 18 | 10 | 2 | 1 | 0 | $4.10 \pm 0.17$ | 0.41 |
| $C_2$ | 0 | 0 | 2 | 9 | 18 | 9 | 1 | 1 | 2 | $4.14 \pm 0.19$ | 0.414 |
| $C_{17}$ | 5 | 18 | 18 | 21 | 8 | 8 | 2 | 0 | 0 | $2.52 \pm 0.22$ | 0.252 |
| $C_{18}$ | 3 | 5 | 14 | 9 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | $2.55 \pm 0.23$ | 0.255 |
| $C_{19}$ | 7 | 11 | 8 | 9 | 9 | 5 | 1 | 0 | 0 | $2.42 \pm 0.22$ | 0.242 |

are given in Table 3. It can be seen from the data that symmetrical arrangements like simple chains and rings occurred most frequently. The "frying-pan" type of quadrivalent was seen rarely (Fig. 2). The mean number of chiasmata per cell in the different tetraploids is given in Table 1. There is apparently no difference in the chiasma frequency of plants belonging to the different generations. The mean frequency of chiasmata per cell in diploid *Toria* was 18.3. There is thus no prominent difference between the diploids and autotetraploids in the number of chiasmata per bivalent. From the data in Tables 1 and 2 it is clear that there is a decrease in the frequency of quadrivalents and an increase in the frequency of bivalents in the $C_{17}$, $C_{18}$, $C_{19}$ generations in comparison with $C_1$ and $C_2$ generations (see also Figs. 1 to 8). The data were subjected to a 't' test and it was found that the differences in the mean frequency of quadrivalents and bivalents between the early and late generations were highly significant. Thus, there is a definite tendency for an increase of normal bivalent synapsis in the later generations. In comparison with $C_1$ plants, there is an increase in the frequency of trivalents and univalents in the subsequent generations (Fig. 9). Ramanujam and Deshmukh (1945) reported a quadrivalent frequency of only

Table 3. *Types of quadrivalents observed*

| Generation | No. of quadrivalents of type | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | — — - — | | | | | |
| $C_1$ | 37 | 6 | 12 | 101 | 0 | 1 |
| $C_2$ | 17 | 5 | 10 | 106 | 1 | 1 |
| $C_{17}$ | 11 | 8 | 4 | 143 | 0 | 0 |
| $C_{18}$ | 16 | 0 | 5 | 59 | 0 | 0 |
| $C_{19}$ | 3 | 4 | 9 | 68 | 0 | 0 |

1.94 per cell in $C_1$ plants of autotetraploid *Toria*. The maximum number of quadrivalents in a cell observed by them was 5. The mean frequency of 4.1 multi-



Figs. 1—9. Metaphase I of meiosis in autotetraploid *B. campestris* var. *toria*
Figs. 1—3. $C_1$ generation. Figs. 4 and 5. $C_2$ generation. Fig. 6. $C_{18}$ generation. Figs. 7—9. $C_{19}$ generation. Fig. 1. $_{7}IV + {}_{6}II$. Fig. 2. $_{5}IV + {}_{9}II + {}_{2}I$. Note the "frying-pan" type of quadrivalent (arrow). Fig. 3. $_{4}IV + {}_{1}III + {}_{10}II + {}_{1}I$. Fig. 4. $_{8}IV + {}_{3}II + {}_{2}I$. Fig. 5. $_{8}IV + {}_{3}II + {}_{2}I$. Fig. 6. $_{20}II$. Fig. 7. $_{3}IV + {}_{1}III + {}_{12}II + {}_{1}I$. Fig. 8. $_{1}IV + {}_{1}III + {}_{16}II + {}_{1}I$. Fig. 9. $1 + {}_{16}II + {}_{5}I$.

valents per cell found by us in $C_1$ plants is hence much higher than that recorded by them. Howard (1939) observed an average of 4 quadrivalents per cell in autotetraploid *Brassica oleracea* ($2n = 36$) and the frequency observed by us in *Toria* is of a similar order. Even in auto-octoploid *Toria*, Ramanujam and

Deshmukh (1945) observed only one quadrivalent per cell and it seems probable that the cytological preparations obtained by them were not suitable for a critical study.

**Pollen and Seed Fertility.** The pollen and seed fertility data collected from the plants subjected to cytological examination are summarised in Table 4. It will be noticed that while pollen fertility is more or less the same in all the plants, seed setting is very poor in the early generations. There has been a striking improvement in fertility in the $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations. As already mentioned, the plants of the later generations are derivatives of the mass pedigree system of selection adopted by Parthasarathy and Rajan (1953). The tetraploids of the $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations have nearly the same seed fertility as the diploids.

Table 4. *Pollen and seed fertility in tetraploid Toria*

| Generation | Mean percentage of stainable pollen | No. of seeds per siliqua | |
|---|---|---|---|
| | | range | mean |
| $C_1$ | 92.6 | 0—3 | 1.5 |
| $C_2$ | 91.1 | 1—5 | 3.0 |
| $C_{17}$ | 95.0 | 7—20 | 14.5 |
| $C_{18}$ | 90.1 | 8—20 | 14.9 |
| $C_{19}$ | 90.2 | 10—21 | 16.8 |

## Discussion

Gilles and Randolph (1951) were the first to demonstrate the occurrence of a gradual shift from a multivalent to bivalent type of synapsis in an induced autopolyploid. From their observations on chromosome pairing in a strain of autotetraploid maize at the beginning and end of a ten year period, they concluded that multivalent associations of chromosomes which are characteristic of most autopolyploids of recent origin may not persist indefinitely in succeeding generations. If this happens, the possibility exists that many natural polyploids with regular bivalent configurations may have originated as autopolyploids. Müntzing and Prakken (1940) had earlier suggested the same possibility since they found a genotypically controlled tendency to form only bivalents in an autotriploid *Phleum pratense*. Of still greater interest is the recent finding of Riley and Chapman (1958) and Sears and Okomoto (1958) that the regular bivalent formation normally found in *Triticum aestivum* is under the control of a single gene or a block of genes situated in one chromosome pair. In the absence of this chromosome pair, pairing occurs among the homologous chromosomes belonging to the different genomes, while in its presence, pairing is restricted to the wholly homologous chromosome pairs within each genome. There is thus abundant evidence now to suggest that there is a tendency for autopolyploids — both naturally occurring and induced — to acquire either gradually or suddenly the cytological characteristics of a diploid.

The results of the present study indicate that the tendency for reduced multivalent formation following selection for some years found by Gilles and Randolph (1951) in maize, also exists in *Toria*. Our data show even a more striking drop in multivalent formation than that recorded in maize. This may be due to the fact that *Toria* being a plant with small chromosomes with not more than one chiasma per chromosome arm in a bivalent, the initial coefficient of realization of multivalents is itself low. Also, we have studied tetraploid plants which are nearly twice as old as the maize tetraploids investigated by

Gilles and Randolph (1951), and which have been subjected to an intense breeding pressure. Bremer and Bremer-Reinders (1954) found a positive effect on regularity of meiosis by recurrent selection of fertile plants during 7 generations in autotetraploid winter rye. Hilpert (1957) also observed that selection for high seed setting and good tillering has a pronounced effect in increasing the frequency of bivalent associations in autotetraploid rye. While the data concerning the direct correlation between multivalent frequency and seed setting in autopolyploid plants reported by different authors are in many cases contradictory and confusing, it is clear that in several autotetraploids there is a decrease in multivalent associations and a rise in bivalent frequency coincident with an increase in seed fertility. Our data as well as those of Bremer and Bremer-Reinders (1954) and Hilpert (1957) are quite in accord on this point though the plant species studied are different. Thus, while there may be no positive correlation between multivalent frequency and seed sterility within plants of an autopolyploid population in any particular season, the increase in seed setting brought about by practising selection and breeding among them seems to be invariably accompanied by a significant increase in the number of chromosomes forming bivalents. The relationship between these two events, hence, may not be wholly casual and Darlington's (1937) original surmise concerning the role of multivalents in causing seed sterility may to a great extent be correct. It is not clear whether increase in seed fertility and decrease in multivalent frequency are the only coincident effects of the evolution given by the plant breeder to an induced autopolyploid population. In autotetraploid rye, Hilpert (1957) found that even selection for tillering was effective in bringing about a shift towards more regular meiosis. On the other hand, where the stress of selection has been on factors like fodder yield in addition to seed fertility, there is apparently no increase in meiotic regularity with increasing fertility (Armstrong and Robertson 1956). In cross-pollinated plants like maize, rye and *Toria* which are grown solely for seed there is a common trend with regard to this relationship. Only the extent of the shift witnessed varies, probably depending on the initial coefficient of realization of multivalents and the breeding system adopted.

How is this gradual diploidization as regards meiotic behaviour brought about in an autopolyploid plant grown primarily for its seed? There are two major possibilities. First, the initially homologous chromosomes of an induced autopolyploid may undergo sufficient divergence by the accumulation of structural changes, both large and cryptic, so as to bring about a significant shift from a multivalent to a bivalent type of synapsis in the "evolved" as compared to the "raw" polyploids. Stebbins (1956) has shown that it will be possible to experimentally induce this shift by resorting to irradiation techniques. Secondly, the changes tending to convert an autopolyploid into a functional diploid may be genically controlled. The effectiveness of selection and hybridization in increasing the seed fertility of autopolyploids is generally attributed to the evolution of favourable gene combinations. The same process is apparantly effective in reducing the multivalent frequency since a genotypically controlled tendency for bivalent formation in some autopolyploids seems to be now well established. These two mechanisms, however, may not be mutually exclusive. On the other

hand they may operate simultaneously and their cumulative effect may condition the pace with which the diploidization process progresses. The genetic mechanism controlling the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat, as postulated by Riley and Chapman (1958), however, seems to be of a single major gene type and these authors believe that the development of this "multivalent suppressor" gene (or gene system) could have arisen by mutation. No such mutation has been detected so far in induced autopolyploid plants and all the available evidence suggests that the shift from a multivalent to a bivalent type of pairing happens only slowly and progressively. The fact that sudden variation with regard to this character has not so far been observed in induced autopolyploid plants does not, however, invalidate in any way the wheat findings. Bread wheat is more a segmental allopolyploid and the possibilities for such changes to occur are hence greater than in a pure autopolyploid. In the *Toria* tetraploids studied by us, the only evidence in favour of a slight accumulation of structural changes was provided by the observed increase in the frequency of trivalents and univalents in the later generations. The small size of the chromosomes rendered critical karyotypic studies difficult and we have no direct data to suggest that structural changes have occurred in the evolved tetraploids. It is also questionable whether spontaneous structural changes would occur at such a rapid rate as to account for the observed difference in multivalent frequency between the early and late generations. It seems more likely that both genic control as well as some degree of structural differentiation are involved. Whatever may be the precise mechanisms responsible, it is of considerable interest that a gradual process of cytological diploidization occurs in autotetraploid *Toria* simultaneously with a reduction in seed sterility and as a result, it is difficult to refrain from inferring a relationship between the two both in cause and consequence. That factors other than multivalent formation are also concerned with seed fertility in the autotetraploid *Toria* population is, however, obvious since some degree of multivalent formation persists in the evolved tetraploids though the seed fertility in such plants has reached the diploid level.

## Summary

1. The types of chromosome associations found during diakinesis and metaphase I of meiosis in microsporocytes was studied in plants belonging to the $C_1$, $C_2$, $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations of induced tetraploids of strain 22 of *Brassica campestris* var. *toria*. It was found that there was a considerable decrease in the frequency of multivalents and increase in the frequency of bivalents in tetraploid plants belonging to the later generations in comparison with those belonging to the earlier generations.

2. The mean number of seeds per siliqua in the $C_1$ and $C_2$ tetraploids was 1.5 and 3.0 respectively, while this number increased to 14.5, 14.9 and 16.8 in $C_{17}$, $C_{18}$ and $C_{19}$ generations respectively. The increase in seed fertility had been brought about by adopting the mass pedigree system of selection.

3. From the observation that coincident with an increase in seed fertility there is a tendency towards a decrease in multivalent frequency in autotetraploid *Toria*, it is suggested that the relationship between these two processes may not be wholly casual.

**Acknowledgment.** We are indebted to Dr. B. P. Pal, Director, and Dr. A. B. Joshi, Head of the Division of Botany, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, for their interest in this study. Our sincere thanks are due to Mr. S. S. Rajan for placing at our disposal the material used in this study.

## Literature

Armstrong, J. M., and R. W. Robertson: Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. I. Cross and self fertility and cytological observations. Canad. J. agric. Sci. **36**, 255—266 (1956). — Bremer, G., and D. E. Bremer-Reinders: Breeding of tetraploid rye in the Netherlands. I. Methods and cytological investigations. Euphytica **3**, 49—63 (1954). — Darlington, C. D.: Recent advances in cytology, 2. edit. Philadelphia: Blakiston 671 pp. 1937. — Gilles, A., and L. F. Randolph: Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. Amer. J. Bot. **38**, 12—17 (1951). — Hagberg, A.: Frekvensen av plantor med avvikande kromosomtal i marknadspartior av tetraploid råg (Dubbelstålråg). Kungl. Lantbruksakad. Tidskr. **92**, 417—427 (1953). — Harland, S. C.: Methods and results of selection experiments with Peruvian Tanguis cotton. Part I. A survey of present methods of cotton breeding and a description of the "Mass Pedigree System". Part II. The "Mass Pedigree System" in practice. Emp. Cotton Gr. Rev. **26**, 163—174, 247—255 (1949). — Hilpert, G.: Effect of selection for meiotic behaviour in auto-tetraploid rye. Hereditas (Lund) **43**, 318—322 (1957). — Howard, H. W.: The cytology of autotetraploid Kale, *Brassica oleracea*. Cytologia (Tokyo) **10**, 77 bis 87 (1939). — Müntzing, A.: Cytogenetic properties and practical value of tetraploid rye. Hereditas (Lund) **37**, 18—84 (1951). — Chromosomes in relation to species differentiation and plant breeding. Conference on chromosomes, W. E. J. Tjeenk Willink, Zwelle the Netherlands. Lecture **6**, 1—37 (1956). — Müntzing, A., and R. Prakken: The mode of chromosome pairing in *Phleum* twins with 63 chromosomes and its cytogenetic consequences. Hereditas (Lund) **26**, 463—501 (1940). — Parthasarathy, N., and S. S. Rajan: Studies in the fertility of autotetraploids of *Brassica campestris* var. *toria*. Euphytica **2**, 25—37 (1953). — Rajan, S. S.: The effectiveness of the mass pedigree system of selection in the improvement of seed setting in autotetraploids of *Toria*. Indian J. Genet. **15**, 47—49 (1955). — Ramanujam, S., and M. J. Deshmukh: Colchicine induced polyploidy in crop plants. III. Oleiferous Brassicae. Indian J. Genet. **5**, 63—81 (1945). — Riley, R., and V. Chapman: Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature (Lond.) **182**, 713—715 (1958). — Sears, E. R., and M. Okomoto: Proc. 10. Int. Congr. Genet. **2**, 258—259 (1958). — Stebbins, G. L.: Artificial polyploidy as a tool in plant breeding. Brookhaven. Symp. Biol. **9**, 37—52 (1956). — Swaminathan, M. S., M. L. Magoon and K. L. Mehra: A simple propionocarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. Indian J. Genet. **14**, 87—88 (1954).

M. S. Swaminathan and K. Sulbha,
Indian Agricultural Research Institute, Division of Botany, New Delhi, India

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 393—399 (1959)

From the Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India
(Director: Dr. B. P. Pal)

# EFFECT OF X-RADIATION ON POLLEN TUBE GROWTH AND SEED SETTING IN CROSSES BETWEEN NICOTIANA TABACUM AND N. RUSTICA

By

M. S. Swaminathan and B. R. Murty

With 2 Figures in the Text

*(Received August 5, 1959)*

Treatment of pollen with different types of radiations has been done in many plants usually with one of the following aims: (a) to study the cytological and physiological changes resulting from the irradiation; (b) to induce mutations; (c) to induce haploidy and (d) to overcome problems arising from self- and cross-incompatibility. While extensive data are now available concerning radiation effects on pollen germination, functionability and mitosis, information relating to the rate of growth of pollen tubes following irradiation, studied either *in vitro* or *in vivo*, is scanty. This aspect of study is of considerable plant breeding interest in view of the possibilities for overcoming cross-incompatibility barriers arising from slow or inadequate pollen tube growth, in case the rate of growth of the pollen tube could be stimulated by irradiation.

The cross between *Nicotiana tabacum* and *N. rustica* (both have $2n = 48$) takes only when the latter is used as the pistillate parent. Even in this direction, seed setting is poor owing to the prevalence of somatoplastic sterility (Brink and Cooper 1941). Seed setting fails altogether in the reciprocal cross since the pollen tubes of *N. rustica* do not traverse the whole length of the *tabacum* style (Swaminathan and Murty 1957a). This inadequate growth seemed to arise from the natural adaptation of *rustica* pollen to a shorter style rather than to the operation of any inhibitory factor. Studies on the effect of X-radiation on pollen tube growth in *Nicotiana tabacum* and *N. rustica* and of applying X-rayed pollen on the extent of incidence of somatoplastic sterility in the cross *N. rustica* × *N. tabacum* were hence undertaken and the results are summarised in this paper.

## Material and Methods

"Ravanjak", a Yugoslavian cigarette type of *N. tabacum* and "N. P. 219", an improved variety of *N. rustica* evolved at the Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, were used in the study. Both these varieties flowered profusely and had abundant quantities of good pollen. Pollen were collected from 50 to 60 flowers selected at random from 20 plants of *N. rustica* and 5 plants of *N. tabacum*. The pollen of each species were spread on separate slides and irradiated with different doses of X-rays. The X-ray dosage given amounted to 2400 r per minute (50 KV; 2 mA without filter, the pollen being kept at a distance of 15 cms from the tube). For the sake of convenience, the various X-ray doses given are indicated in this paper according to the time of exposure. The exposure times used were 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 15 minutes.

Pollen of both *N. rustica* and *N. tabacum* were found to germinate well in an agar-sucrose medium comprising 0.5 grams of agar and 3.0 grams of sugar in 25 ccs. of water. The control and irradiated pollen were transferred to drops of this medium smeared on slides and the slides were kept at 25° C in petridishes covered with moist filter paper. The percentage of pollen germination and the length of the pollen tubes were recorded 24 hours after the pollen were dusted on the medium. Acetocarmine was used to stain the pollen and a minimum of 300 pollen grains and 100 pollen tubes were studied for calculating the percentage of germination and rate of tube growth respectively. For *in vivo* measurements of pollen tube growth, a radiotracer technique was used (Swaminathan and Murty 1957 b).

In the first experiment, only the four low doses (i. e., 0.25, 0.5, 0.75 and 1 minute exposures) were used. Since pollen tube growth appeared to be stimulated at these levels of radiation, a wider range of exposure times were used in two subsequent experiments. As the variances in control and 14,400 r treatment were similar in the two experiments, a pooled estimate of the variance has been made in these cases for comparison with the other levels of radiation. Test of significance was carried out according to Fisher-Behren's test.

## Results

**Germination of Pollen.** The data relating to the germination of pollen at different dosages are represented in Fig. 1. No significant reduction in germination occurred upto 2400 r; above this dosage there was a progressive reduction in germination ending in complete inhibition at 28,800 r in *tabacum*. In *rustica*, there was 3.2% germination at 36,000 r which was the highest dosage tried in the experiment.

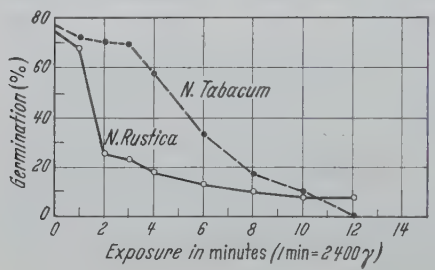


Fig. 1

**Pollen tube growth.** The rate of pollen tube growth in a unit time increased upto a certain level of radiation. Thus, stimulation in growth occurred when *tabacum* pollen were exposed to 2400, 4800 and 7200 r while the rate of growth continued to rise upto a dose of 9600 r in *rustica*. Beyond these dosages, there was a gradual fall in the rate of pollen tube growth. The data are given in Table 1 and Fig. 2. The results of the statistical analysis of the data are also indicated in Table 1.

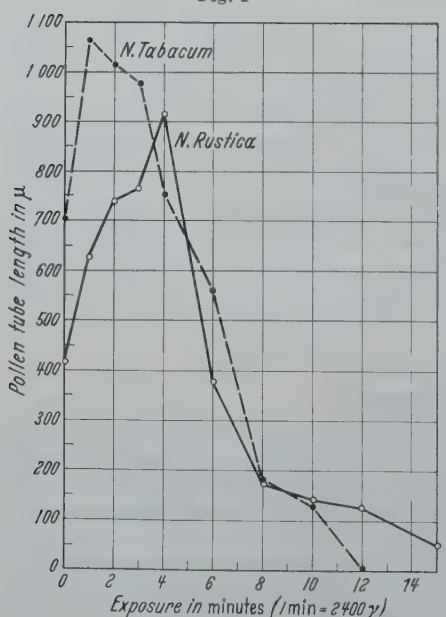


Fig. 2

At 14,400 r and above, several pollen tubes presented a discontinuous appearance owing to the cytoplasm remaining unstained at some points. The length of such segments varied from 12 to 32 microns. The percentage of such tubes was 2.2, 4.2, 8.9 and 9.5 at 14,400, 19,200, 24,000 and 28,800 r respectively in *rustica* and 6.06, 6.89 and 6.67 at 14,400, 19,200 and 24,000 r respectively in *tabacum*. Thus, while there was an increase in the incidence of such abnormal tubes with an increase in dosage in *rustica*, there was no such rise in *tabacum*.

**Effect of pollen irradiation on seed setting.** Pollen of *tabacum* and *rustica* irradiated with 1200, 2400, 4800, 9600 and 12000 r were used in pollinating emasculated flowers in the parent plants in order to obtain an estimate of their functionability. Twenty flowers were used in each treatment and the data on seed setting (Table 2) revealed that at doses of 4800 r and above there is a significant drop in the number of seeds set per berry. The per centage of decrease in seed setting at 12000 r was far greater in *tabacum* when compared with *rustica*.

Table 1. *Effect of X-rays on pollen tube growth*

| Code | Dose in "r" units | *N. rustica* | | *N. tabacum* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Mean tube length in microns | % over control | Mean tube length in microns | % over control |
| A | 0 | 419.7 | 100 | 705.0 | 100 |
| B | 2400 | 626.1 | 149.2 | 1062.0 | 150.5 |
| C | 4800 | 749.9 | 178.5 | 1009.5 | 143.1 |
| D | 7200 | 765.2 | 182.2 | 980.3 | 138.9 |
| E | 9600 | 917.9 | 218.7 | 753.8 | 106.9 |
| F | 14400 | 383.3 | 91.3 | 559.7 | 79.3 |
| G | 19200 | 185.6 | 44.3 | 178.1 | 25.2 |
| H | 24000 | 138.1 | 32.9 | 130.5 | 18.5 |
| I | 28800 | 127.6 | 30.4 | 6.5 | 0.9 |
| J | 36000 | 62.9 | 15.0 | 0 | — |
| Significance: | | EDCBAFGHIJ | | BCDEAFGHIJ | |

In order to study the effects of applying irradiated pollen on seed setting in the cross *tabacum* × *rustica* (as mentioned earlier, this cross fails due to the incomplete growth of *rustica* pollen tube in *tabacum* style), *rustica* pollen irradiated with 1200, 2400, 4800, 9600 and 12,000 r were used to pollinate emasculated *tabacum* flowers. As can be seen from the data in Table 2, some seeds were obtained in crosses involving pollen irradiated with 4800 and 9600 r. The autoradiographs taken after pollinating *tabacum* flowers with pollen from *rustica* plants cultured in nutrient solutions containing $P^{32}$ and irradiated with 9600 r of X-rays prior to pollination showed that the pollen tubes reached the base of the *tabacum* style. The plants raised from the seeds obtained in crosses involving irradiated *rustica* pollen were real hybrids. Thus, the use of *rustica* pollen irradiated with 4800 and 9600 r of X-rays did help in overcoming the one-way incompatibility found in the *tabacum* × *rustica* cross.

Table 2. *Effect of pollen irradiation on seed setting*

| X-ray dose | Mean number of seeds per capsule | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *rustica* | *tabacum* | *tabacum* × *rustica* | *rustica* × *tabacum* |
| Control | 428 | 1400 | 0 | 11 |
| 1200 r | 338 | 1220 | 0 | 89 |
| 2400 r | 435 | 1475 | 0 | 51 |
| 4800 r | 278 | 1150 | 27 | 16 |
| 9600 r | 165 | 610 | 18 | 0 |
| 12000 r | 68 | 51 | 0 | 0 |

When irradiated *tabacum* pollen were used in crosses with *rustica*, seed setting was better upto a dose of 4800 r. In crosses with normal *rustica* pollen, a few seeds are set but most ovules abort. Brink and Cooper (1941) have reported that in this cross, fertilization is normal but many young embryos collapse as a result of the hyperplastic development of the nucellar and endothelial cells. Application of irradiated pollen thus improves in some way the chances for the fertilized embryos to mature into viable seeds.

## Discussion

Several views have been advanced to explain the inhibition of pollen germination resulting from X- and other radiations. Kaplan (1940) studied the effects

of high X-ray dosages on *Antirrhinum* pollen and concluded that ionizations change or destroy "Steuerungszentren" or catalyzing and enzyme activity within the cells thereby causing a gradual decrease in germination. Fröier and Gustafsson (1941) emphasised the need for taking into consideration the exterior conditions under which cytoplasmic or purely chemical processes are acting alone after the irreversible destruction of the nucleus induced by the treatment. According to Koller (1943), lack of germination of normal-looking pollen grains indicates that the vegetative nucleus, which is the centre of the mechanism conditioning the reaction between the pollen grain and its medium of growth, is damaged. During the present study, it was found that at the higher X-ray dosages many pollen grains though normal in appearance when stained with acetocarmine did not germinate. The first pollen mitosis is completed in tobacco before anthesis and consequently irradiation of the binucleate pollen could lead to the damage of the vegetative or generative nucleus or of both. All these factors may be responsible for the observed inhibition in germination after a certain level of radiation.

While simple growth inhibition is a common consequence of irradiation, stimulation of growth following treatment with different mutagens has also been reported by several authors. The question whether ionizing radiation can stimulate growth has been the subject of much controversy. As Ehrenberg (1955) has pointed out, the contradictory findings may suggest that in the diverse experimental material used, certain inhibitory factors controlling radiosensitivity may be present in some cases and absent in others. Stimulation in pollen tube growth following irradiation has been observed by Brown and Cave (1954) in *Lilium* and by Nikitin (1934) in some trees. Such stimulation should be due to a more rapid cell elongation arising probably from changes in the viscosity of the plasm. Virgin and Ehrenberg (1953) have demonstrated that low radiation doses cause changes in plasma viscosity which are typical of true cell stimulation.

Some differences were observed in the relative radiosensitivity of *N. rustica* and *tabacum* pollen. Thus, the percentage of pollen germination in *rustica* was 29.61 at 7200 r while it was 88.55 in *tabacum*. The average size of pollen in *rustica* and *tabacum* are 41.6 and 32.4 microns respectively and this difference in size may be one of the factors responsible for the observed difference in radiosensitivity. The functional ability of X-rayed pollen has been studied critically in *Lilium formosanum* by Brown and Cave (1954). Cave and Brown (1954) found several cytological abnormalities in ovules of *L. formosanum* fertilised by gametes from pollen irradiated with 4000 r of X-rays and suggested that while mechanical difficulties in mitosis are the most effective cause of the abnormalities, genetic unbalance and toxic effects of irradiation may also be causal agents. In both *rustica* and *tabacum*, we observed a decrease in seed fertility with an increase in the radiation dose applied to the pollen. Seed setting was reduced even at doses which did not impair greatly either pollen germination or tube growth. It seems likely that a considerable proportion of this sterility is diplontic caused by radiation induced genetic unbalance in the male gamate.

Lewis (1946) pointed out many years ago the use of radiations for producing self-fertile mutants in plants normally self-incompatible owing to the operation of the *S*-allele system. The use of ionizing radiations for overcoming interspecific and inter-generic crossability barriers is, however, a relatively new devel-

opment. Reusch (1956) crossed *Lolium perenne* and *Festuca pratensis* using pollen irradiated with gamma rays and found that the seeds obtained from such a cross germinated better than those got from using normal pollen. He concluded from the seed setting data that irradiation induces changes in consequence of which endosperm development and hence seed germination are improved. The changes induced seem to depend upon the initial disparity existing between the genotypes. Tanaka (1957) crossed *N. tabacum* reciprocally with some species of the *alata* group (*N. alata*, n = 9; *N. langsdorfii*, n = 9; *N. longiflora*, n = 10), using pollen irradiated with 4800 to 9600 r of X-rays. The crosses were successful only when *N. tabacum* was used as the pistillate parent. He, therefore, concluded that the use of radiation is restricted to the direction of the cross in which the pollen parent has a lower number of chromosomes.

From our study, it appears that pollen irradiation may help in overcoming inter-specific cross-incompatibility in the genus *Nicotiana* conditioned by two different causes. First, the stimulation induced in the rate of growth of the pollen tube may help in circumventing difficulties caused by differences in the relative style lengths of the two species used in a cross. Secondly, in cases of somatoplastic sterility occurring in crosses between parents possessing the same chromosome number, the use of irradiated pollen induces in some way a better development of the seed and consequently results in an increased seed setting and seed viability. Irradiation, however, may not help to overcome difficulties arising from a disturbance in the 2:3:2 chromosome number relationship among the embryo, endosperm and mother tissue which is normally necessary for a healthy development of the embryo in many angiosperms. The success obtained by Tanaka (1957) in getting hybrids between *N. tabacum* and species of the *alata* group by using irradiated pollen may be due to a quantitatively better growth of pollen tubes following irradiation.

In what way can the use of irradiated pollen enhance the physiological and developmental harmony necessary within an embryosac for a young embryo to mature into a viable seed ? While it is difficult to answer this question precisely at present, the studies of Polyakov *et al.* (1958) on the process of fertilization and seed development in several plants provide a possible explanation. These authors studied fertilization in *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. longiflora*, *N. sylvestris*, *Gossypium hirsutum*, *Hibiscus cannabinus*, maize, peas and other plants using pollen labelled with $S^{35}$ or $P^{32}$, applied at various times after pollination with normal pollen. In an inter-varietal cross in cotton, when the labelled pollen was applied 6 hours after the normal pollen, the progeny contained not more than 10% of hybrid plants, as shown by the presence of dominant characters from the pollen parent. Applications after a longer interval produced only 2—3% of hybrids. Nevertheless, a certain degree of radioactivity was detected in the resulting seeds, even in those that did not appear to be hybrids, the amount diminishing roughly in proportion to the time lag between the application of normal and labelled pollen. In pollinations of *N. rustica* "Yellow 109" with lebelled pollen of "High Green" the proportion of hybrids was not more than 4% but the seeds that developed showed radioactivity. A comparison of the amount of $P^{32}$ in the pollen and the resulting seeds suggested that radioactive materials had passed into the developing seed from pollen grains varying in number from 3 to 8. Polyakov *et*

*al.* (1958) also found that 70% or more of the radioactivity transmitted by the foreign pollen was localized in the embryo and endosperm of the resulting seeds and they suggest that it is transmitted in the form of complex organic compounds which may penetrate from the pollen grain to the developing seed even after double fertilization has been effected. It thus seems likely that besides the male gametes which actually participate in fertilization, the contents of other pollen tubes, which enter the ovary but do not take part in fertilization, may also have some role to play in the development of the seed. Irradiation induced biochemical changes in the pollen may hence prove to be advantageous when conditions for seed development are abnormal as in instances of somatoplastic sterility. It is obvious that besides such indirect beneficial biochemical effects, radiations may help to inactivate genetically controlled zygotic lethal factors. Further research in this field is hence likely to yield rich rewards.

## Summary

*In vitro* and *in vivo* studies of the effect of irradiating pollen with different doses of X-rays were carried out in *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*. Dosages upto 9600 r were found to enhance the rate of growth of pollen tubes per unit time. Advantage was taken of this observation to overcome the incompatibility normally found in the cross *N. tabacum* × *N. rustica* as a result of the inadequate growth of *rustica* pollen tubes in *tabacum* style. Thus, when *rustica* pollen exposed to 4800 r and 9600 r of X-rays were used to pollinate *tabacum*, fertilization resulting in the formation of viable hybrid seeds occurred. In the cross *N. rustica* × *N. tabacum* there is partial seed failure as a result of the hyperplastic development of the nucellar and endothelial cells. However, when X-rayed *tabacum* pollen were used in the cross, seed development registered a marked improvement. Since there is now evidence for suggesting that the contents of even those pollen tubes which do not participate in fertilization have some role to play in the development of the seed, it seems likely that radiation-induced biochemical changes in pollen may prove advantageous when conditions for seed development are abnormal as in instances of somatoplastic sterility. Besides such indirect biochemical effects, irradiation of pollen may also lead to genetic changes resulting in the inactivation of zygotic lethals. Thus, there is much scope for investigating the use of radiation to overcome inter-specific and inter-generic cross-incompatibility barriers.

**Acknowledgments.** We are greatly indebted to Dr. B. P. Pal, Director, Indian Agricultural Research Institute and Dr. A. B. Joshi, Head of the Division of Botany for their advice and encouragement.

## Literature cited

Brink, R. A., and D. C. Cooper: Incomplete seed failure as a result of somatoplastic sterility. Genetics **26**, 487—505 (1941). — Brown, S. W., and M. S. Cave: The detection and nature of dominant lethals in *Lilium*. I. Effects of X-rays on the heritable component and functional ability of the pollen grain. Amer. J. Bot. **41**, 455—469 (1954). — Cave, M. S., and S. W. Brown: The detection and nature of dominant lethals in *Lilium*. II. Cytological abnormalities in ovules after pollen irradiation. Amer. J. Bot. **41**, 469—483 (1954). — Ehrenberg, L.: Factors influencing radiation induced lethality, sterility and mutations in barley. Hereditas (Lund) **41**, 123—146 (1955). — Fröier, K., and Å. Gustafsson: The influence of X-ray dosage on germination and sprouting ability in barley and wheat. Svensk bot. T. **35**,

43—56 (1941). — Kaplan, R.: Experimentelle und theoretische Untersuchungen über den Mechanismus der Keimschädigung durch Röntgenstrahlen beim Pollen von *Antirrhinum majus* L. Biol. zbl. **60**, 298—318 (1940). — Koller, P. C.: The effects of radiation on pollen grain development, differentiation and germination. Proc. roy. Soc. Edinb. B. **6**, 398—429 (1943). — Lewis, D.: Useful X-ray mutations in plants. Nature (Lond.) **158**, 519 (1946). — Nikitin, I.: Effect of X-rays on the pollen of woody and herbaceous plants. Sovet. Bot. **1**, 66—74 (1934). — Polyakov, I. M., A. N. Dmitrieva and A. P. Zdrilko: Application of radioactive isotopes in the study of plant fertilization. Radioisotopes in scientific research, vol. 4, p. 690. London: Pergamon Press (1958). — Reusch, J. D. H.: Influence of gamma radiation on the breeding affinities of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. Nature (Lond.) **178**, 929—930 (1956). — Swaminathan, M. S., and B. R. Murty: One-way incompatibility in some species crosses in the genus *Nicotiana*. Indian J. Genet. **17**, 23—26 (1957a). — Use of radioactive tracers in the study of pollen tube growth. Curr. Sci. **26**, 59—60 (1957b). — Tanaka, M.: The application of X-rayed pollen in crosses of *Nicotiana*. I. The effect on reciprocal crosses between tobacco and some species of the section *Alatae*. Jap. J. Breed. **7**, 39—44 (1957). — Virgin, H. I., and L. Ehrenberg: Effects of $\beta$ and $\gamma$ rays on the protoplasmic viscosity of *Helodea* cells. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 159—165 (1953).

M. S. Swaminathan and B. R. Murty,
Indian Agricultural Research Institute, Division of Botany, New Delhi, India

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 400—408 (1959)

Aus den Botanischen Instituten der Universitäten München und Tübingen

# ZUR KENNTNIS REZIPROKER KREUZUNGEN VON *FUNARIACEEN*

## I. DIE BASTARDE *FUNARIA HYGROMETRICA* × *PHYSCOMITRIUM ACUMINATUM* UND REZIPROK

Von

LEOPOLD BAUER und MARIA BROSIG*

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 10. Mai 1959)*

F. v. WETTSTEIN (1924, 1928) hat bei seinen Kreuzungsexperimenten in der Familie der Funariaceen Unterschiede zwischen reziproken Bastarden gefunden und auf verschiedene Beschaffenheit der Plasmone zurückgeführt. Um an seine Untersuchungen wieder anzuknüpfen (die Arbeiten wurden seit seinem Tode nirgends weitergeführt), wählten wir aus dem neugesammelten Material als Partner von *Funaria hygrometrica* zunächst *Physcomitrium acuminatum*, das sich durch kurze Entwicklungszeit und gute Kreuzbarkeit mit *Funaria* in beiden Richtungen auszeichnet. Diese Art hat v. WETTSTEIN zwar nicht bearbeitet, die Ergebnisse mit ihr dürften aber mit den anderen Funariaceenkreuzungen vergleichbar sein.

### Material und Kreuzungsmethode

*Funaria hygrometrica* (Symbol *Hy* in Anlehnung an v. WETTSTEIN) wurde 1946 in der Nähe von Karlsfeld bei München gesammelt. Die Chromosomenzahl ist die gleiche ($n = 14$), wie sie v. WETTSTEIN (1924) für seine Sippen bestimmte. — *Physcomitrium acuminatum* (Symbol *Acu*) entstammt der Umgebung von Kurf bei Endorf. Für die Nachbestimmung danken wir Herrn Prof. Dr. PAUL, München. Als wahrscheinliche Chromosomenzahl ermittelten wir $n = 25$ (mindestens 24, höchstens 26); die schwierigen Zählungen ergaben zwölfmal 25, dreimal 24 und einmal 26. Bezüglich der morphologischen Charakterisierung beider Arten verweisen wir auf LIMPRICHT. Zu den Versuchen wurden unter sterilen Bedingungen kultivierte Klone verwendet.

Mit der „Schwimmermethode" v. WETTSTEINS (1924) hatten wir bisher wenig Erfolg. Als günstig erwies sich dagegen eine einfachere Methode, die auch v. WETTSTEIN schon gelegentlich angewandt hat, und die wir an unsere Objekte anpaßten. Protonemen oder junge Pflänzchen beider Arten wurden im Impfkasten auf in Blumentöpfen sterilisierte Erde zusammengepflanzt. Bei dieser Methode ist einmal zu beachten, daß *Hy* sich wesentlich rascher auf dem Substrat aus breitet als *Acu*, und andererseits *Acu* früher zur Geschlechtsreife als *Hy* neigt. Sowohl die Mengenverhältnisse der beiden Partner, als auch der Zeitpunkt des Zusammenpflanzens müssen daher sorgfältig ausgewogen werden. Bis zum Auftreten der Geschlechtsorgane müssen die Blumentöpfe durch Glasdeckel vor Infektion mit unerwünschten Sporen geschützt und die Töpfe von unten bewässert werden. Nach Entfernung der Glasdeckel wird durch wiederholtes Begießen Befruchtung ausgelöst. Meist findet man unter den zahlreichen Sporogonen eine größere Anzahl Bastarde.

Da sich die Kapselformen der beiden Eltern (Abb. 1) sehr stark voneinander unterscheiden, war es nicht schwer, den Bastardcharakter der reifenden Sporogone festzustellen (Abb. 2), besonders wenn man zum Vergleich die Abbildungen der sehr ähnlichen Kapseln

* Unter teilweiser Verwendung einer Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München von M. BROSIG (1953).

aus den vergleichbaren Kreuzungen v. Wettsteins (1924, 1928) herangezieht (*HyPi*, *PiHy* und *EuHy*)[1]. Die Ergebnisse der Arbeit bestätigten die richtige Auswahl der Sporogone.

Abb. 1. Die beiden Eltern; links *Physcomitrium acuminatum (Acu)*, rechts *Funaria hygrometrica (Hy)*

## Morphologische Beschreibung und Vergleich der Bastarde

**Vorbemerkung.** Es wurden insgesamt 203 Bastardsporogone der Kombination *AcuHy* und 46 der Verbindung *HyAcu* erhalten. Obwohl die Ausbeute auch in den Kreuzungen mit *Hy* als Mutter im Vergleich zu v. Wettsteins Ergebnissen beträchtlich ist, wird die Bastardierung in dieser Richtung doch durch irgendeinen Umstand behindert. v. Wettsteins Erfahrungen liegen in der gleichen Richtung, wenn er findet, daß bei Gattungskreuzungen die Kombination mit *Hy* als Mutter meist nicht zu verwirklichen ist. Der Grund dafür ist noch nicht bekannt. Aber bevor wir plasmatische Unterschiede verantwortlich machen, müssen noch andere Möglichkeiten geprüft werden. Vielleicht ist eine räumliche Behinderung des Befruchtungsaktes mitverantwortlich. In diese Richtung weisen die Meßergebnisse in Tabelle 1.

Tabelle 1. *Vergleichende Messungen der Archegonhalslängen und -weiten, sowie der Durchmesser der Spermatozoidspiralen*

| Objekt | n | Archegonhalslänge $\mu$ | ± M | n | Archegonhalsweite $\mu$ | ± M | n | Durchmesser der Spermatozoidspirale | ± M |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Acu* | 20 | 405,50 | 7,38 | 30 | 5,00 | 0,16 | 40 | 4,6 | 0,17 |
| *Hy* | 15 | 494,00 | 14,10 | 30 | 4,64 | 0,12 | 30 | 4,2 | 0,11 |

**Größe und Gestalt der Bastardsporogone.** Es zeigten sich keine Reziprokenunterschiede im morphologischen Bild (Abb. 2). Die Beschreibung gilt also für *beide* Kreuzungskombinationen. Es darf an dieser Stelle bemerkt werden, daß

[1] Die reziprok verschiedenen Bastarde werden nach v. Wettstein (1924) in der Weise charakterisiert, daß das Symbol der Pflanze, die als *Mutter* gedient hat, an die *erste* Stelle geschrieben wird.

auch die Kapseln von *HyPi* und *PiHy*, die v. Wettstein beschreibt, auffällig ähnlich sind.

Die Setalänge beträgt durchschnittlich 30 mm. Sie kann allerdings je nach den äußeren Bedingungen, unter denen die Sporogonentwicklung vor sich geht, erheblich schwanken. Auf jeden Fall liegt sie zwischen der der beiden Eltern und ist stark *Hy* angenähert. Die Seta ist unten links- und oben rechtsgedreht, gerade und aufrecht, nur selten ganz schwach geboren, niemals gekrümmt wie bei *Hy*. Die Seta verbreitert sich ziemlich rasch aber kontinuierlich in Halsteil und Kapsel. In der Apophyse finden sich zahlreiche einzellige Spaltöffnungen.

Abb. 2. Die reziproken Bastardsporogone; links die Kombination *Acu* ♀ × *Hy* ♂, rechts *Hy* ♀ × *Acu* ♂

Die Kapsel ist leicht asymmetrisch, und zwar schief birnförmig und hochrückig, nach der Seite geneigt. Hier manifestiert sich ein *Hy*-Merkmal, denn *Acu* hat eine symmetrische Kapsel (Abb. 1). Ein Peristom fehlt; es sind auch keine Peristomrudimente vorhanden, wie sie bei v. Wettstein in der Verbindung *PiHy* und reziprok auftraten. Dieses Merkmal entspricht also *Acu*. Auch der die weite Mündung begrenzende Ring ist einzellreihig wie bei *Acu*, während die *Hy*-Kapsel einen zwei- bis dreizelligen Ring aufweist. Der Deckel ist kegelig schwach genabelt gegenüber dem flach gewölbten, ungenabelten bei *Acu* und *Hy*. — Die Sporen sind sehr unregelmäßig, die Größen schwanken zwischen 15 und 27 $\mu$; sie sind dunkelbraun gefärbt, die Oberflächenstruktur ist grob gekörnt. Neben einer großen Anzahl abortierter Sporen finden sich auch Tetraden. Die Sterilität ist sehr hoch. Der geregelte Ablauf der Meiosis ist durch die unterschiedlichen Chromosomenzahlen gestört. Aus 28 ausgereiften Kapseln der Verbindung *AcuHy* gelangten nur 5 Sporen zur Keimung, doch konnten nur 3 von ihnen in Weiterkultur genommen werden. In der Verbindung *HyAcu* keimten nur 7 Sporen, welche gesondert aufgezogen wurden. Auch v. Wettstein machte die Erfahrung, daß Bastardsporogone bisweilen fast nur sterile Sporen enthalten.

**Morphologische Beschreibung und Vergleich der Regeneratgametophyten**

**Die Maße der Protonemazellen.** Die Protonemen, welche aus den verschiedensten Teilen eines Bastardsporogons gebildet wurden, wiesen unter sich keine Unterschiede auf. Sie zeigten ein gutes Wachstum. Sie sind nach der Nomenklatur v. Wettsteins bivalent. Es ist daher notwendig, bei einem Vergleich von Größenangaben mit ihren Eltern auch deren bivalente Sippen heranzuziehen. Die Messungen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2. *Die Maße der Protonemazellen bei 1000 Lux (Leuchtstofflampe)*

| Objekt | Zellänge $\mu$ | ± M | Zellbreite $\mu$ | ± M | Volumen $\mu^3$ | n |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *AcuHy* | 208,02 | 1,50 | 18,18 | 0,20 | 53971 | 100 |
| *HyAcu* | 207,05 | 1,60 | 18,25 | 0,15 | 54134 | 100 |
| *Acu* dipl. | 124,65 | 1,50 | 22,91 | 0,19 | 51358 | 175 |
| *Hy* dipl. | 253,00 | 0,89 | 20,20 | 0,21 | 81039 | 150 |

Die wesentlich größeren Volumina, welche Straub (1948) bei Protonemazellen haploider *Funaria hygrometrica* fand, lassen sich mit unseren Werten nicht vergleichen. Straub verwendete direktes Regenerationsprotonema (großzellige Caulonemen ?), während unser Material durch ständige Übertragungen auf frisches Substrat über viele Wochen als knospenfreies Chloronema kultiviert worden war.

Das Bastardprotonema bildet rasch Pflänzchen, und einige Wochen später zeigen sich beiderlei Geschlechtsorgane. Nach der Befruchtung entstehen Sporogone, welche den Ausgangsbastarden bis auf geringe Größenunterschiede völlig gleichen.

**Gestalt und Größenverhältnisse der Perichätialblätter.** Die Perichätialblätter der Regeneratgametophyten beider Bastarde sind morphologisch gleich gestaltet (Abb. 3). 1—2 Reihen langer schmaler Zellen begrenzen den Blattrand, der durchaus *Acu*-ähnlich erscheint und keine *Hy*-Merkmale erkennen läßt. Auch das Zellnetz der Lamina läßt sich gut mit der des *Acu*-Blattes vergleichen und zeigt wenig *Hy*-Ähnlichkeit. In den Maßen der Blattzellen (Fläche, Dicke, Volumen) lassen sich bei beiden Bastarden statistisch keine Unterschiede feststellen.

**Paraphysengestalt.** Nach v. Wettstein (1942) kommt der Gestalt der Paraphysen ein besonderer systematischer Wert zu. Auch sie sind in den Bastardgametophyten reziprok nicht verschieden. In beiden Fällen tragen die kräftigen Stielzellen unregelmäßig kugelig geformte Endzellen. Ähnlich sind die *Acu*-Paraphysen, nicht dagegen diejenigen von *Hy* (Abb. 3).

**Die $F_1$-Nachkommen von HyAcu und reziprok.** Von den zahlreichen protokollierten Daten und Messungen seien nur diejenigen angeführt, die für den Vergleich mit den Eltern von Bedeutung sind (vgl. dazu Abb. 3).

1. *$F_1$ von HyAcu.* Nr. 1 und 2 sind die Nachzuchten der zwei einzigen keimenden Sporen einer Kapsel. Sie weisen untereinander und mit der Bastardmutter *HyAcu* so große Ähnlichkeit auf (Zellmaße des Protonemas, des beblätterten Stämmchens und Sporogonform), daß die Vermutung naheliegt, daß bei der Sporenbildung die Reduktionsteilung ganz ausgeblieben ist. Auf eine Abbildung wird verzichtet.

Nr. 3: Das Protonema bildet bucklige polsterförmige Inseln. Die Stämmchenbildung ist sehr verzögert. An den Zellen der Blattlamina erkennt man *Hy*-Charaktere, aber die Randzellen der unteren Blatthälfte ähneln durch ihre Länge mehr *Acu*. Der Blattumriß der Spitzenregion steht zwischen beiden Eltern. Die Geschlechtsorgane sind steril die Paraphysen sind beiden Eltern unähnlich.

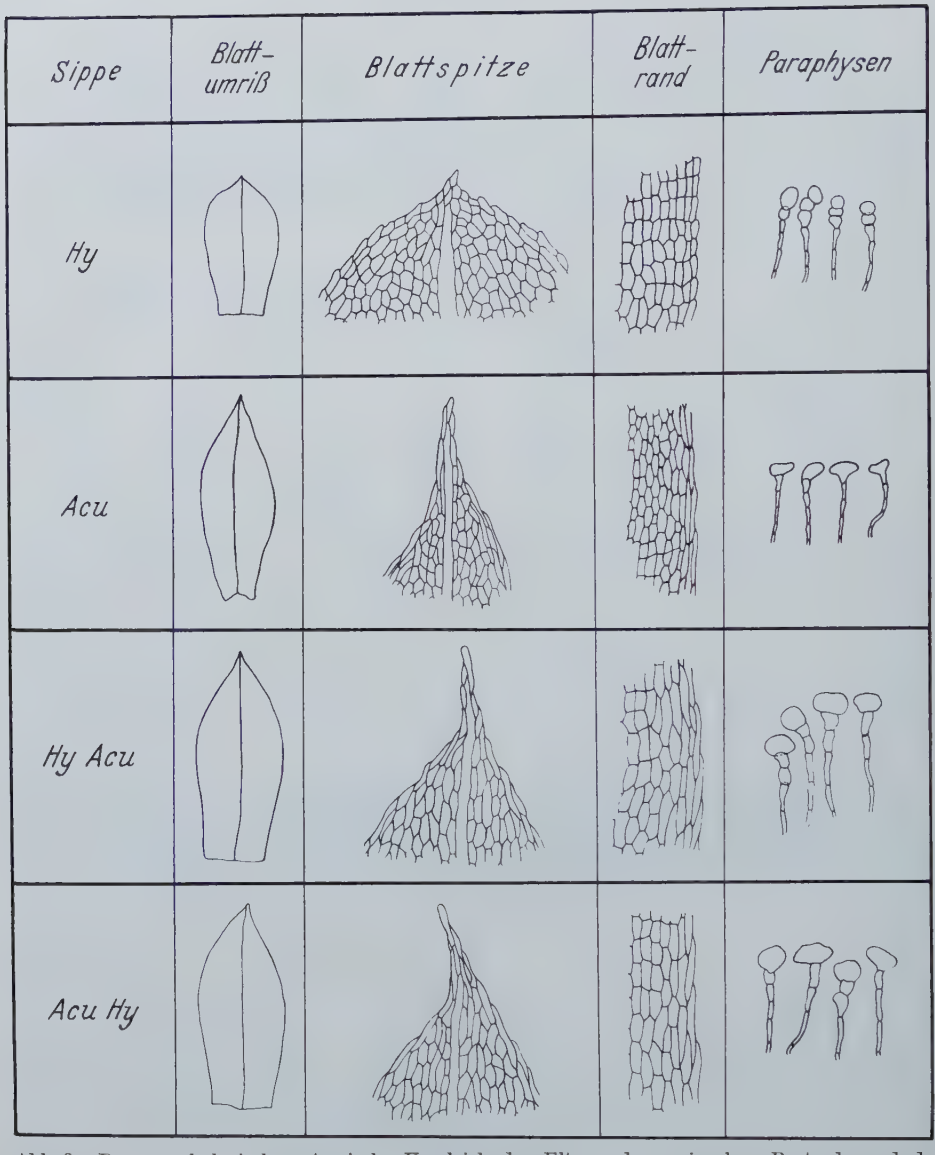



Abb. 3. Der morphologisch-anatomische Vergleich der Eltern, der reziproken Bastarde und der $F_1$-Nachkommen

Nr. 4, 6, 7: Diese aus 3 verschiedenen Kapseln stammenden Sporennachkömmlinge können gemeinsam beschrieben werden. Sorgfältige Prüfungen aller morphologischen Merkmale (Abb. 3) einschließlich der Zellmaße des Protonemas, sowie genaue Wachstumsvergleiche machen es im höchsten Grade wahrscheinlich, daß die 3 Sippen die gleiche genetische Konstitution besitzen. Wenn wir die beiden offenbar nicht reduzierten Sporen (Nr. 1 und 2) ausnehmen, dann haben über die Hälfte der offensichtlich veränderten, aber lebensfähigen $F_1$-Nachkommen diese gleiche chromosomale Ausrüstung. Wenn man berücksichtigt, daß wegen der gestörten Reduktionsteilung die Verteilung der Chromosomen unregelmäßig erfolgt, dann handelt es sich offenbar um eine relativ günstige Chromosomenkombination.

Das Protonema wächst flächig und breitet sich rasch aus. Nach 3—4 Wochen sind die Töpfe mit frischgrün beblätterten Stämmchen bedeckt; sie werden etwa 6,2 mm hoch. Die

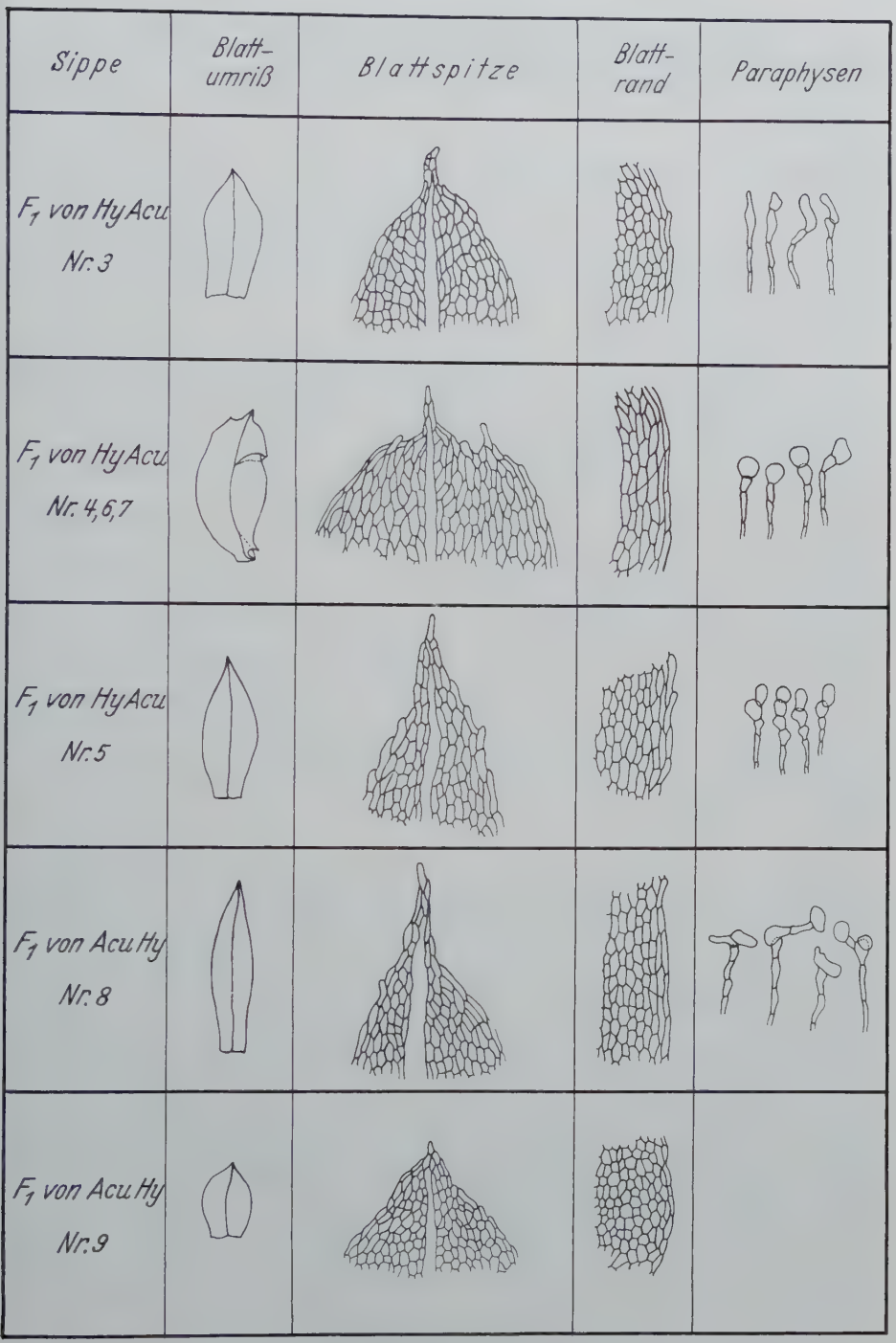



Abb. 3. (Fortsetzung)

Blätter sind wellig, zeigen häufig an Lamina und Mittelrippe flächige Auswüchse und trichterförmige Einstülpungen, oder sie weisen 2 Spitzen auf. Der Blattrand wird von 1—2

schmalen, langgestreckten, dicht aneinanderschließenden Zellreihen gesäumt wie bei *Acu*. Nach 11—12 Wochen zeigen sich beiderlei Geschlechtsorgane. Es erfolgt auch eine Befruchtung und Sporogonbildung, doch sterben die Sporogone in einem sehr frühen Stadium aus unbekannten Ursachen ab. Die Paraphysen stehen in ihrer Ausbildung zwischen den beiden Eltern.

Nr. 5 besitzt bucklige, kleine Polster bildende Protonemen. Nach etwa 6 Wochen zeigen sich vereinzelt Stämmchen; sie bleiben klein und kümmerlich, werden 1,8—2 mm hoch und bilden lanzettliche Blättchen, deren Ränder durch längere, fingerförmig ausbuchtende Zellen unregelmäßig gezähnt sind. Ein solcher Blattrand findet sich bei keinem Elternteil. Nach etwa 5 Monaten erscheinen kurze, gedrungene, fast kugelförmige Antheridien; die Archegonienbildung bleibt gänzlich aus. Die Paraphysen sind keulenförmig, die Stielzellen schlank, die oberen angeschwollen und unregelmäßig ausgebeult; entfernt kann man *Hy*-Merkmale herauslesen.

2. *$F_1$ von AcuHy*. Nr. 8 wächst auf der Protonemastufe rasch und bildet sehr schnell beblätterte Pflanzen (5—6 mm hoch). Beiderlei Geschlechtsorgane werden gebildet, sind aber steril. In den Einzelheiten der Blattmerkmale kommt *Acu* stark zum Ausdruck. Die Paraphysen gleichen weder denen von *Acu*, noch denen von *Hy*.

Nr. 9 hat begrenztes inselförmiges Protonemawachstum. Die beblätterten Gametophyten (4 mm hoch) bringen keine Geschlechtsorgane hervor. Die morphologische Beschaffenheit läßt weder einen bevorzugten *Hy*- noch *Acu*-Einfluß erkennen.

Nr. 10 bildet keine Stämmchen; die Kultur wächst langsam als polsterförmiges Protonema.

**Physiologischer Vergleich der Bastarde.** *1. Protonemawachstum.* Ein besonders empfindlicher Indikator für den physiologischen Zustand der Zellen ist das Wachstum.

Wir untersuchten, wie die reziproken Bastardprotonemen auf verschiedene Änderungen der Kulturbedingungen hinsichtlich ihrer Zellmaße und Zellteilungsgeschwindigkeit reagierten. Die Objekte wurden sowohl im Schwachlicht (250 Lux), als auch in Dunkelkulturen in verschiedenen $p_H$-Stufen[1] verglichen. Die reziproken Partner beantworteten alle Änderungen der äußeren Kulturbedingungen in gleicher Weise.

Aus den zahlreichen Einzelbefunden seien einige Daten herausgegriffen: Das Optimum der Zellteilung (im Schwachlicht ohne Glucose etwa 1,33 Zellen/Tag; im Dunkeln mit Glucose etwa 1,04 Zellen/Tag) lag zwischen $p_H$ 6 und 7; die Zelllängen waren im Dunkeln größer als im Licht (z. B. bei $p_H$ 6: dunkel etwa 240 $\mu$, im Schwachlicht etwa 206 $\mu$). Die größten Zellvolumen wurden im Dunkeln bei $p_H$ 7—8 (etwa 57230 $\mu^3$) und im Schwachlicht bei $p_H$ 6—7 (etwa 51300 $\mu^3$) erreicht.

*2. Osmotischer Wert.* Der osmotische Wert wurde an Protonemazellen mit Hilfe der plasmometrischen Methode nach Höfler (1918) bestimmt (vgl. auch Becker 1932). Die Protonemen wurden bei konstanten Licht- und Temperaturbedingungen vorkultiviert, und es wurden nur solche Zellen zu den Messungen verwendet, welche während der Versuchszeit neu gewachsen waren. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 3 zu entnehmen.

Wir finden hier den ersten Reziprokenunterschied, der aber mit 0,83 Atm. so gering ist (obwohl er sich statistisch sichern läßt), daß wir ihn nur mit äußerstem Vorbehalt wiedergeben. Die Methode ist zwar genau genug, um solche kleinen

[1] Die Nährlösung wurde durch tropfenweisen Zusatz von $^1/_{10}$ n HCl und $^1/_{10}$ n NaOH auf verschieden sauere und alkalische Stufen gebracht. Die Pufferkapazität der eingestellten Lösung war wegen der geringen Salzkonzentration gering, so daß die angegebenen $p_H$-Werte nur als Anfangswerte zu verstehen sind.

Differenzen mit Sicherheit zu erfassen, eine andere Frage ist es allerdings, ob wir damit wirklich einen echten Unterschied in der *genetischen* Konstitution charakterisiert haben. Auch bei Anzucht in der Klimakammer ist oft eine geringfügige physiologische Verschiedenheit der einzelnen Kulturröhrchen nicht vermeidbar.

*3. Blattfarbdifferenzen zwischen den reziproken Partnern.* Der einzige wirklich eindeutige Reziprokenunterschied betraf gewisse Veränderungen im Farbstoffgehalt der Blättchen zur Zeit der Geschlechtsreife. Wir wollen auf dieses Phänomen etwas näher eingehen.

Tabelle 3. *Die osmotischen Werte der Protonemazellen*

| Objekt | Atm. | ± M | n |
|---|---|---|---|
| *AcuHy* | 12,85 | 0,01 | 50 |
| *HyAcu* | 12,02 | 0,19 | 50 |
| *Acu* hapl. | 13,47 | 0,04 | 50 |
| *Acu* dipl. | 12,49 | 0,04 | 50 |
| *Hy* hapl. | 10,92 | 0,096 | 50 |
| *Hy* dipl. | 9,76 | 0,10 | 50 |

Haploide Moosrasen von *Acu* sind stets dunkler grün als die mehr zu gelbgrün neigenden *Hy*-Rasen. Die Bastardrasen von *AcuHy* und *HyAcu* besitzen zur Zeit kräftigen Wachstums, also vor dem Auftreten der Gametangienstände, etwa die gleiche Farbe wie *Acu*. Sobald Geschlechtsorgane auftreten (Gewächshauskultur), bleichen aber die Rasen von *HyAcu* im Gegensatz zum reziproken Partner merklich aus und nähern sich im Farbton weitgehend dem *Hy*-Rasen (durch Photographie belegt). Der Effekt wird besonders deutlich und der Kontrast entsprechend groß, wenn man die Blumentöpfe von unten bewässert, so daß eine Befruchtung ausbleibt. Bei Dauerbeleuchtung unter der Leuchtstofflampe (1000 Lux) unterbleibt die Ausbildung der Geschlechtsorgane und ebenso die Farbveränderung in *HyAcu*.

Läßt man die Töpfe jedoch zu trocken stehen, dann bleichen auch die Blätter von *AcuHy* zum Teil beträchtlich aus. Es handelt sich also um eine Reaktion, zu der zwar beide Bastarde befähigt sind, die aber bei dem einen leichter in Gang kommt.

In zwölf zeitlich auseinanderliegenden Wiederholungsversuchen wurden aus jeweils gleichen Gewichtsmengen (Frischgewicht) Moosblättchen die Farbstoffe eluiert und mittels einer Stärkesäule getrennt; darauf wurde ihre relative Konzentration im Pulfrichphotometer bestimmt. Dabei ergab sich jedesmal, daß in *AcuHy* zur Zeit der Geschlechtsreife die Menge der grünen Pigmente gegenüber der Kontrolle (beide Bastardrasen im nicht geschlechtsreifen, d. h. dunkelgrünen Zustand) nicht oder wenig (maximal um 15%), in *HyAcu* dagegen stark (um 35—50%) verringert war. Von den gelben Pigmenten blieb das Carotin in beiden Bastardkombinationen unverändert. Die Xanthophyllfraktion war bei *HyAcu* nur in 4 Versuchen leicht (8—10%) vermehrt; es ist daher unsicher, ob diese Pigmentänderung auf genetische Ursachen zurückgeführt werden kann. Da das Ausmaß der Reziprokenunterschiede in den einzelnen Versuchen verschieden war, verzichten wir auf die Wiedergabe von genauen Zahlen. Stets lagen aber die Messungen qualitativ in der gleichen Richtung.

## Zusammenfassende Schlußbetrachtung

Die Bastarde *Funaria hygrometrica* (Hy) × *Physcomitrium acuminatum* (Acu) und reziprok wurden in größerer Zahl hergestellt und miteinander verglichen.

Obwohl es sich um Gattungsbastarde handelt, lassen sich weder am Protonema noch am beblätterten Gametophyten in den morphologischen Merkmalen Reziprokenunterschiede feststellen.

Die wenigen lebensfähigen Vertreter der $F_1$-Generation aus beiden Verbindungen waren in keinem Falle ganz oder vorwiegend mutter- oder vaterähnlich ausgeprägt. Es traten neuartige Kombinationen auf.

Auch in bezug auf physiologische Merkmale erwiesen sich die Reziprokenunterschiede als sehr gering.

Die Zellteilungsgeschwindigkeit der Protonemazellen beider Bastarde wies keinen Unterschied auf, auch dann nicht, wenn die Kulturbedingungen experimentell verändert wurden (Licht-Dunkelkultur, $p_H$-Änderungen).

In den Protonemazellen von *HyAcu* wurde der osmotische Wert etwas tiefer (0,83 Atm.) gefunden als in denen von *AcuHy*. Obwohl die Differenz statistisch gesichert werden konnte, ist es doch fraglich, ob damit wirklich echte genetische Differenzen erfaßt wurden.

Dagegen besteht ein auffälliger Unterschied in einem Plastidenmerkmal: Die Blätter der *HyAcu*-Pflanzen neigen zur Zeit der Geschlechtsreife in weit stärkerem Maße zu einem partiellen Chlorophyllschwund als diejenigen der *AcuHy*-Pflanzen. Von den Eltern hat Hy bei Blumentopfkultur die helleren Blätter.

Die Versuche sprechen gegen die Vorstellung, daß mit dem Größerwerden des systematischen Abstandes der Spezies auch eine Vergrößerung der Plasmonunterschiede verbunden ist (v. Wettstein 1928). In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß Michaelis (z. B. 1940, 1944) bei verschiedenen *Sippen* von *Epilobium hirsutum* größere Reziprokenunterschiede gefunden hat als bei verschiedenen *Epilobiumarten*.

Der „Deutschen Forschungsgemeinschaft" danken wir für eine Sachbeihilfe.

## Literatur

Becker, G.: Experimentelle Analyse der Genom und Plasmonwirkung bei Moosen. III. Osmotischer Wert heteroploider Pflanzen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **60**, 17—38 (1932). — Brosig, M.: Zur Kenntnis reziproker Kreuzungen von *Funariaceen*. Diss. München 1953. — Höfler, K.: Eine plasmolytisch-volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. Denkschr. Akad. Wiss., Wien, math.-nat. Kl. **95** (1918). — Michaelis, P.: Über reziprok verschiedene Sippenbastarde bei *Epilobium hirsutum*. I. Die reziprok verschiedenen Bastarde der *Epilobium hirsutum*-Sippe Jena. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **78**, 187—222 (1940). — Untersuchungen an reziprok verschiedenen Artbastarden bei *Epilobium*. I. Über die Bastarde verschiedener Sippen der Arten *E. hirsutum* mit *E. parviflorum*, bzw. *E. montanum*. Flora (Jena), N.F. **37**, 1—23 (1944). — Limpricht, K. G.: Die Laubmoose Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. In L. Rabenhorst, Kryptogamenflora, Bd. 4/II. Leipzig 1895. — Straub, J.: Zur Organisation der Zelle. Biol. Zbl. **67**, 479—489 (1948). — Wettstein, F. v.: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **33**, 1—236 (1924). — Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. II. Bibl. Gen. **10**, 1—214 (1928). — Über einige Beobachtungen und experimentelle Befunde bei Laubmoosen. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 394—414 (1942).

Dozent Dr. Leopold Bauer,
Botanisches Institut der Universität Tübingen, Wilhelmstr. 5

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 409—420 (1959)

# ÜBER CHROMATIDENINTERFERENZ

Von

ELISABETH MÖLLER

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 5. August 1959)*

Die meisten genetischen Befunde sind mit der Annahme verträglich, daß bei mehrfachem Austausch die Beteiligung der Chromatiden zufällig erfolgt. Dabei verhalten sich bei Doppelaustausch die zu erwartenden Häufigkeiten für die Beteiligung von 2, 3 oder 4 Chromatiden wie 1:2:1. Abweichungen von diesem Verhältnis werden als Chromatideninterferenz bezeichnet, und zwar wurde ein Überwiegen von 4-Strang-Beteiligung als positive Chromatideninterferenz definiert, eine Bevorzugung von 2-Strang-Beteiligung entsprechend als negative. Neben diesen beiden Möglichkeiten ist aber auch ein gleichzeitiger Überschuß von 2- und 4-Strang- gegenüber 3-Strang-Beteiligung beobachtet worden sowie das Gegenteil.

Derartige Abweichungen, insbesondere die eindeutigen Befunde von LINDEGREN und LINDEGREN (1942) an *Neurospora crassa*, sind bisher nicht befriedigend erklärt worden. Daher haben SHULT und LINDEGREN (1957a und b) nachdrücklich eine Revision der bestehenden Vorstellungen über die Austauschvorgänge während der Meiosis gefordert und vertreten neuderdings eine Theorie, die lokalisierte crossingover nebst engen interchromosomalen Beziehungen vorsieht.

Im folgenden soll für die am häufigsten diskutierten Beobachtungen von Chromatideninterferenz an *Neurospora crassa* und *sitophila* sowie *Funaria hygrometrica* und *Sphaerocarpus Donnellii* gezeigt werden, daß sich diese Abweichungen weit einfacher unter Beibehaltung der bisherigen Vorstellungen als mechanisch bedingt erklären lassen, hauptsächlich durch die besonderen Verhältnisse in der nächsten Umgebung des Zentromers.

## A. Negative Chromatideninterferenz

Eindeutigen Nachweis negativer Chromatideninterferenz über das Zentromer hinweg brachten LINDEGREN und LINDEGREN (1942). In 3 Versuchen, 1936, 1937 und 1940, wurde ein 19 ME umfassender Bereich des Geschlechtschromosoms von *Neurospora crassa* untersucht, mit den Genen *sex* und *gap* links, *crisp* und *pale* rechts vom Zentromer (s. Abb. 1a). Die Länge der von links nach rechts mit I bis IV bezeichneten Intervalle betrug 4; 3,5; 3,5 und 8 ME.

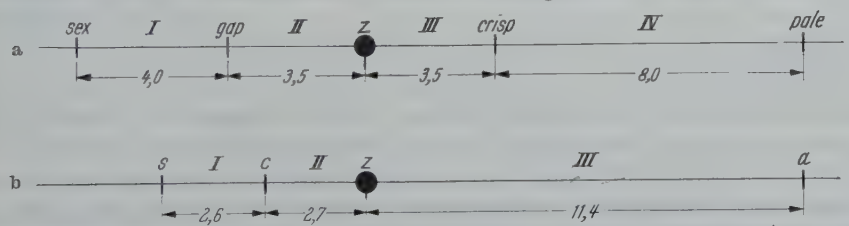



Abb. 1. a Teil des Geschlechtschromosoms von *Neurospora crassa* (LINDEGREN und LINDEGREN 1942). b Teil des squamifera-Chromosoms von *Sphaerocarpus Donnellii* (KNAPP und MÖLLER 1955); *s* = *squamifera*, *c* = *crispa*, *a* = *atra*

In diesem Bereich wurden 1936 unter 78 untersuchten Asci 5 Doppelaustausche über das Zentromer hinweg gefunden, die sich auf 2, 3 und 4 Stränge mit 4:1:0 verteilten. Die entsprechenden Werte für 1937 mit 17:9:6 unter 494 Asci und für 1940 mit 20:5:8 unter 1081 Asci sind in Tabelle 1 nach den verschiedenen Intervallen, in denen sie auftraten, unterteilt, auch sind diejenigen Doppel, die aus 3- und 4fachem Austausch stammen, getrennt aufgeführt. Doppelaustausch innerhalb der Arme, also in den Intervallen I—II bzw. III—IV, sowie 4-Strang-Doppelaustausch in einem Intervall wurden dabei nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 1. *Beteiligung von 2, 3 oder 4 Chromatiden bei Doppelaustausch im Geschlechts-Chromosom von Neurospora crassa* (LINDEGREN und LINDEGREN 1942)

| In den Intervallen | | 1937 Anzahl Tetraden mit Beteiligung von | | | Gesamt | 1940 Anzahl Tetraden mit Beteiligung von | | | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 Strängen | 3 Strängen | 4 Strängen | | 2 Strängen | 3 Strängen | 4 Strängen | |
| II—III | a | 1 | — | 1 | 2 | 9 | 2 | — | 11 |
| | b | 6 | — | — | 6 | 4 | 1 | — | 5 |
| I—IV | a | 10 | 5 | 4 | 19 | 5 | 2 | 2 | 9 |
| I—III | a | — | 2 | — | 2 | 2 | — | — | 2 |
| | b | — | 2 | — | 2 | — | — | 1 | 1 |
| II—IV | a | — | — | — | — | — | — | 4 | 4 |
| | b | — | — | 1 | 1 | — | — | 1 | 1 |
| Gesamt | | 17 | 9 | 6 | 32 | 20 | 5 | 8 | 33 |

a Doppelaustausch, b Doppelaustausch aus 3- und 4fachem Austausch.

Es zeigt sich, daß Doppelaustausch bevorzugt in symmetrischen Abständen vom Zentromer auftritt, in den Intervallen I—IV und II—III. In II—III tritt die 2-Strang-Bevorzugung noch stärker hervor als in I—IV, innerhalb mehrfacher Austausche kommt diese fast ausschließlich vor. Die Beteiligung von 3 Strängen tritt auch gegenüber der von 4 Strängen zurück. Auf Unterschiede zwischen beiden Versuchen soll unten noch näher eingegangen werden.

In die gleiche Richtung weisen, ebenfalls bei *Neurospora crassa*, zahlenmäßig zu kleine Versuche von BARRATT, NEWMEYER und PERKINS. Als Summe aus verschiedenen Versuchen und Intervallen nennt PERKINS (1955) die Werte 9:7:5.

WHITEHOUSE (1956) fand im Geschlechtschromosom von *Neurospora sitophila* ebenfalls negative Chromatideninterferenz in 2 Intervallen, von denen eins das Zentromer einschloß. Die gefundenen Werte 7:3:2 werden bei Anwendung der von WHITEHOUSE (1956) angegebenen Korrekturformel für 3fachen Austausch noch extremer. Hier handelt es sich um lange Intervalle von 19,3 und 80,6 ME, das letztere entspricht etwa dem gesamten von WÜLKER verwendeten Chromosomenstück, und so wird von diesem Versuch im nächsten Abschnitt noch die Rede sein.

Bei *Sphaerocarpus Donnellii* hatte KNAPP (1937) in meist sehr langen Intervallen des *squamifera*-Chromosoms in fast 400 Austauschtetraden keinerlei Anhalt für Chromatideninterferenz gefunden. Ein späterer Versuch (KNAPP und MÖLLER 1955) betraf kurze zentromernahe Intervalle derselben Koppelungsgruppe, die durch die Gene *squamifera* und *crispa* im linken und *atra* im rechten Arm des Chromosoms und durch das Zentromer markiert waren (s. Abb. 1b).

Die Tetraden von *Sphaerocarpus* sind ungeordnet, doch läßt sich Prä- und Postreduktion jedes Merkmals durch Vergleich mit dem stets präreduzierenden Geschlecht unterscheiden: Ein präreduziertes Merkmal erscheint im gleichen Geschlecht, entweder in beiden ♀♀ oder in beiden ♂♂, ein postreduziertes jeweils in einem ♀ und einem ♂. Gekreuzt wurde *s c* ♀ × *a* ♂; die Intervalle waren 2,6; 2,7 und 11,4 ME lang.

Doppelaustausch kam nur selten vor, unter 1042 Tetraden 20× in I—III, 18× in II—III. 4-Strang-Doppelaustausch innerhalb eines Intervalls wurde nur 1mal in III festgestellt. Während nun in I—III die Beteiligung der Chromatiden mit 5:6:4:5 völlig gleichmäßig war (die beiden Möglichkeiten für 3-Strang-Doppels sind hier unterscheidbar) und damit der zufälligen Verteilung entsprach, betrugen die Werte für II—III 13:3:2. Die letztgenannten Zahlen stammten aber zu einem unverhältnismäßig großen Teil aus Tetraden, aus denen nur 3 Pflanzen erwachsen waren, nämlich

9:1:0 aus 236 Tetraden mit nur 3 gekeimten Pflanzen,
4:2:2 aus 806 Tetraden mit 4 Pflanzen.

Zu einem solchen Mißverhältnis lag kein Anlaß vor, denn bei den anderen Tetradentypen waren keine diesbezüglichen Unterschiede aufgetreten, und so mußte ein Fehler bei der Bestimmung der Pflanzentypen angenommen werden.

Da *a* in Verbindung mit *s* schwer zu erkennen ist, waren sämtliche Austauschpflanzen wiederholt durchgesehen worden, bis ihre genetische Struktur einwandfrei feststand. Bei 2-Strang-Doppelaustausch in Intervallen, die beiderseits ans Zentromer grenzen, entstehen jedoch die elterlichen Pflanzentypen, nur in postreduktioneller Verteilung, d. h. im vorliegenden Fall zeigten je eine ♀ und eine ♂ Pflanze die Merkmale eines jeden Elters. Da die Lage von *atra* und *crispa* nicht bekannt war und erst durch diesen Versuch bestimmt werden sollte, wurde erst bei der Auswertung klar, daß gerade diese Anordnung, der wenig Beachtung geschenkt worden war, besondere Aufmerksamkeit verdient hätte.

Als wahrscheinlichster Fehler wurde vermutet, daß in Tetraden, in denen die fehlende Pflanze als *a* ♂ erschlossen worden war, das Merkmal *a* in Wirklichkeit sich bei dem ausgetauschten *s c* ♀ befunden hat und dort übersehen worden ist. Dann hätte in den betreffenden Tetraden nur einfacher Austausch in II stattgehabt. Daß unter den 9 als 2-Strang-Doppel bewerteten Tetraden mit nur je 3 gekeimten Pflanzen 8 diese Konfiguration: *s c* ♀, *a* ♀, *s c* ♂ zeigten, erhöht die Wahrscheinlichkeit dieser Vermutung. Sollten diese 8 Tetraden sämtlich falsch klassifiziert worden sein, so bleibt als Doppelaustausch in II—III in dieser Gruppe nur 1:1:0 und insgesamt 5:3:2.

Diese Zahlen sind zu gering, um bindende Schlüsse daraus zu ziehen, aber doch fällt neben dem Ergebnis des Nachbarintervalls I—III mit 5:10:5 der Unterschied auf.

Die Zahlen dieser Gruppe dürfen nach dem oben Gesagten als zuverlässig gelten, der genannte Fehler konnte sich an anderer Stelle nur noch so auswirken, daß einfacher Austausch von *a* in einigen Fällen übersehen worden sein kann. Für die Veröffentlichung (1955) wurden aber wegen dieser Unsicherheit nur die Befunde der vollgekeimten Tetraden verwendet, die für Doppelaustausch in I—III dort mit 2:4:3:3 angegeben sind.

Zu dem unterschiedlichen Befund in den Intervallen II—III gegenüber I—III mußte offenbar die nahe Nachbarschaft des Zentromers Anlaß gegeben haben. Auch die Angaben der anderen Autoren stammen durchweg aus Intervallen beiderseits des Zentromers, und so ist immer wieder versucht worden,

derartige Abweichungen durch Äquationsteilung bzw. Misassortment des Zentromers zu erklären (LINDEGREN und LINDEGREN 1942, PERKINS 1955, auch WÜLKER 1935), was jedoch bei konsequenter Durchführung stets an anderer Stelle desselben Versuchs zu Unstimmigkeiten führte. Auf jeden Fall versagt diese Deutung bei dem Befund von LINDEGREN 1937 (LINDEGREN und LINDEGREN 1942, LINDEGREN und SHULT 1957), da dort Intervalle betroffen sind, die nicht unmittelbar ans Zentromer grenzen.

Versuche von HOWE (1956) und STADLER (1956a und b) legen nahe, daß nuclear passing (= Vertauschen der mittleren Kerne am Ende der 2. Teilung) vereinzelt vorkommt, nach STADLER zu 0,2—0,5%, HOWES Zahlen sind zu klein und nicht eindeutig. Doch hat schon WHITEHOUSE (1942) ausführlich dargelegt, daß LINDEGRENS Befund von 1937 auch durch nuclear passing nicht erklärt werden kann, denn die Tetradentypen, die durch ein solches Ereignis in erster Linie vermehrt entstehen würden, sind nur in minimalen Anzahlen vertreten.

Dagegen bietet sich eine *Erklärung von verblüffender Einfachheit aus der Lage nahe dem Zentromer:* Die Chromosomen, die schon in ganzer Länge in Chromatiden aufgespalten sind, werden im Zentromer noch zusammengehalten. In dessen unmittelbarer Nähe besteht daher eine gewisse Starrheit. Paaren zwei Chromatiden dort, so liegen dieselben beiden Chromatiden auch auf der andern Seite des Zentromers einander am nächsten und haben einfach deshalb eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung an einem dortigen 2. Austausch. 3-Strang-Beteiligung muß auch gegenüber 4-Strang-Doppelaustausch zunächst zurückstehen, weil sie auf einer Seite Austausch in der Diagonale erfordert; das Nachbarchromatid liegt aber näher, und Austausch mit ihm ist deshalb wahrscheinlicher. Somit ergibt sich für zentromernahe Intervalle die Tendez 2-Strang > 4-Strang > 3-Strang-Beteiligung über das Zentromer hinweg.

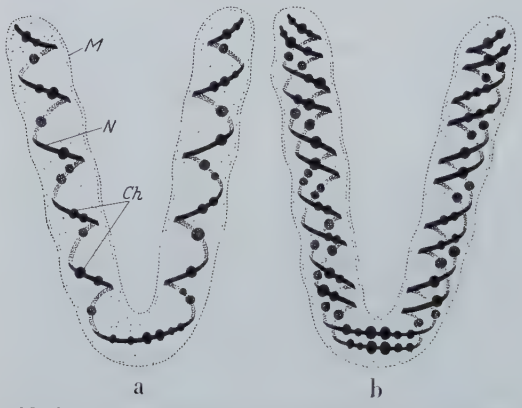



Abb. 2. a Das spiralige Chromonema *N*, das die Chromomeren *Ch* trägt, teilt sich (b) vor der Längsspaltung des Chromosoms in 2 Spiralen. *M* Matrix. Verändert nach HEITZ. Aus SCHMEIL-SEYBOLD, Lehrbuch der Botanik, 52. Auf., Bd. II. S. 8, Abb. 8

Die unverkennbare Neigung zur Symmetrie in LINDEGRENS Versuchen sowohl von 1937 wie auch von 1940 wird durch Abb. 2 verständlich, in der die spiralige Aufwicklung des Chromonemas, wovon bei Beginn der Meiosis offenbar noch ein Rest vorhanden ist, beiderseits des Zentromers in entgegengesetztem Sinne verlaufend dargestellt ist (SCHMEIL-SEYBOLD 1944, leider dort ohne genaue Angabe der Herkunft). Während bei Doppelaustausch in den symmetrisch gelegenen Intervallen II—III und I—IV 2-Strang-Beteiligung eindeutig überwiegt, ist bei nichtsymmetrischer Lage der beiden crossing over, in I—III und II—IV, 3- bzw. 4-Strang-Beteiligung bevorzugt; auch das leuchtet bei der dargestellten Art der Umwindung, der die homologen Chromatiden ja

zwangsläufig folgen müssen, ein und ebenso auch die Tatsache, daß auch die Chromosomeninterferenz in der Umgebung des Zentromers negativ ist, so daß ein Austausch in einem Arm die Bereitschaft für einen nahegelegenen 2. Austausch im andern Arm nicht herabsetzt, sondern erhöht, wie das in LINDEGRENS Daten der Fall ist. LUDWIG (1938) zeigte diesen Einfluß des Zentromers für *Drosophila* an Genkurven, in denen die jeweilige Mapdistance zweier Gene ein Kreisbogenstück darstellt, die zugehörige Sehne ihren Rekombinationswert. Für das einschenklige Geschlechtschromosom von *Drosophila melanogaster* und ebenso von *Dros. funebris* und *Dros. willistoni* ist diese Genkurve ein Halbkreis vom Durchmesser 50 ME, der nur am proximalen Ende noch stärker zum Mittelpunkt hin gekrümmt ist; die Kurven für die zweischenkligen Chromosomen II und III von *Dros. mel.* dagegen sind Spitzbögen, bei denen der Knick das Zentromer anzeigt.

Die Zone, in der der Einfluß des Zentromers auf die Beteiligung der Chromatiden bei Doppelaustausch wirksam ist, läßt sich nicht genau abgrenzen. Eine so weitreichende Wirkung wie bei LINDEGREN 1937 mag ein Ausnahmefall sein. Bei *Sphaerocarpus* herrschte in dem oben genannten Versuch schon jenseits von *crispa* (2,7 ME vom Zentromer entfernt) streng zufällige Verteilung. Es ist daher nicht verwunderlich, daß STADLER (1955) in Intervallen von 10,4 und 16,6 ME beiderseits des Zentromers keine Bestätigung von LINDEGRENS Beobachtungen finden konnte (LINDEGREN und SHULT 1957).

LINDEGRENS Versuch von 1940 war bei niedrigerer Temperatur durchgeführt worden als der von 1937, und so legt das unterschiedliche Ergebnis beider Versuche nahe, daß die Temperatur einen maßgeblichen Einfluß auf die Länge der zentromerabhängigen Zone ausübt. STADLER (1956a) erwähnt, daß niedere Temperatur zentromernahen Austausch zu begünstigen scheint. Auch in LINDEGRENS Versuchen zeigt sich bei der niederen Temperatur von 1940 deutlich eine Verlagerung der Doppelaustausche von I—IV nach II—III (s. Tabelle 1), wo 2-Strang-Bevorzugung noch stärker hervortritt. Im rechten Arm ist auch das Verhältnis von Einzelaustauschen von IV nach III verschoben: Von 79 Einzelaustauschen des rechten Arms befanden sich 1937 16 = 20,3% in III, 1940

Tabelle 2. *Kombination von 0,1 und 2 crossingover im linken Arm mit 0,1 und 2 crossingover im rechten Arm* (LINDEGREN und LINDEGREN 1942)

| re. / li. | 0 | 1 | 2 | Gesamt | re. / li. | 0 | 1 | 2 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Absolut 1937 | | | | | Absolut 1940 | | | |
| 0 | 339 | 79 | 1 | 419 | 0 | 711 | 203 | 4 | 918 |
| 1 | 42 | 23 | 4 | 69 | 1 | 127 | 26 | 1 | 154 |
| 2 | 1 | 3 | 2 | 6 | 2 | 3 | 1 | 4 | } 9 |
| | | | | | 3 | — | 1 | — | |
| Gesamt | 382 | 105 | 7 | 494 | Gesamt | 841 | 231 | 9 | 1081 |
| | Prozent 1937 | | | | | Prozent 1940 | | | |
| 0 | 68,7 | 16,0 | 0,2 | 84,9 | 0 | 65,7 | 18,7 | 0,4 | 84,8 |
| 1 | 8,5 | 4,6 | 0,8 | 13,9 | 1 | 11,7 | 2,5 | 0,1 | 14,3 |
| 2 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 1,2 | 2 | 0,3 | 0,1 | 0,4 | } 0,9 |
| | | | | | 3 | — | 0,1 | — | |
| Gesamt | 77,4 | 21,2 | 1,4 | 100,0 | Gesamt | 77,7 | 21,4 | 0,9 | 100,0 |

dagegen 61 von 203 = 30%. Im linken Arm ist eine solche Verlagerung nicht festzustellen, mit 54 von 127 Einzelaustauschen = 42,6% ist der Anteil in II fast der gleiche geblieben wie 1937 mit 18 von 42 = 42,8%.

In Tabelle 2 sind LINDEGRENS Zahlen nach dem Auftreten der Austausche im linken bzw. rechten Arm des Chromosoms in ihrem gegenseitigen Zusammentreffen angeordnet und die Versuche von 1937 und 1940 einander gegenübergestellt, oben die absoluten Zahlen der Asci, unten die Häufigkeiten in Prozent. Beobachtete 4-Strang-Doppel in einem Intervall sind mitgezählt; einer davon, in II oder III aufgetreten, wurde in II eingruppiert.

Die Häufigkeiten von doppeltem Austausch sind 1940 durchweg geringer als 1937, sie betragen 1937 im linken Arm 1,2, im rechten 1,4%, 1940 in beiden je 0,9%. Dabei ist ein Zusammentreffen mit einem weiteren Austausch im andern Arm sehr selten, jedoch mit 2 weiteren im andern Arm unverhältnismäßig häufig. Gleichzeitiges Auftreten von je einem Austausch in jedem Arm ist ebenfalls herabgesetzt, von 4,6 auf 2,5%. Hingegen sind die Häufigkeiten für einfachen Austausch erhöht, links von 8,5 auf 11,7%, rechts von 16,0 auf 18,7%, so daß die Gesamtaustauschhäufigkeit mit 39,0% gegenüber 40,4% kaum geringer ist. Die Werte für 0—4 crossing over im gesamten untersuchten Bereich betragen:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1937: | 68,7 | 24,5 | 5,0 | 1,4 | 0,4%, |
| 1940: | 65,7 | 30,4 | 3,2 | 0,2 | 0,5%. |

Der Anteil in beiden Armen ist beidemal der gleiche: 40,5% der Austausche befinden sich im linken, 59,5% im rechten Arm.

Zusammenfassend ist über den *Einfluß der Temperatur* zu sagen: Niedere Temperatur bewirkt eine proximale Verlagerung der Austausche und infolgedessen einen höheren Grad negativer Chromatideninterferenz (Bevorzugung von 2-Strang-Doppel) und gleichzeitig eine erhöhte positive Chromosomeninterferenz, wodurch die Häufigkeit mehrfacher Austausche sowohl innerhalb der Arme als auch über das Zentromer hinweg geringer wird. Alle diese Auswirkungen lassen auf eine geringere Biegsamkeit der Chromatiden bei niederer Temperatur schließen.

### B. Bevorzugte 3-Strang-Beteiligung?

WHITEHOUSE (1942 und 1956) hat dargelegt, daß ein 3. Austausch, der sich mit 3-Strang-Beteiligung anschließt, stets einer etwa bestehenden Chromatideninterferenz entgegenwirkt und die Unterschiede verwischt oder, bei entsprechender Häufigkeit, sogar ins Gegenteil verkehren kann. Letzteres ist offenbar in einem Versuch von WÜLKER (1935) am Geschlechtschromosom von *Neurospora sitophila* der Fall, wo die fraglichen Tetradentypen 8:28:8mal gefunden wurden. WÜLKER benutzte neben dem Geschlechtsmerkmal das Merkmal L/l, Bildung

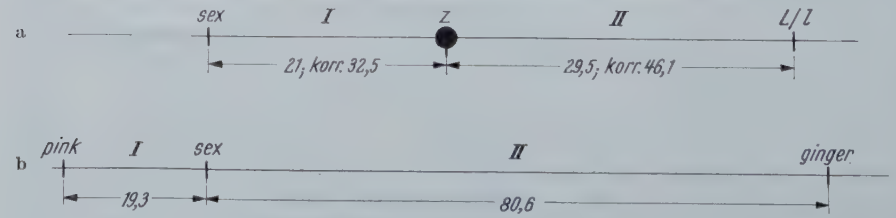



Abb. 3a u. b. Teil des Geschlechtschromosoms von *Neurospora sitophila*. a WÜLKER 1935, b WHITEHOUSE 1956

bzw. Fehlen von Luftmycel. Zwischen beiden Merkmalen bestand mit 42% Rekombination nur schwache Koppelung.

Die genetische Länge von *sex* bis zum Zentromer ist bei *Neur. sitophila* bedeutend größer als bei *Neur. crassa*, was jedoch nicht notwendig auf eine größere reale Länge schließen läßt. Verschiedene Forscher (nach Whitehouse 1942) fanden bei meist nur geringen Zahlen von Asci Werte zwischen 46 und 58% Postreduktion. Im vorliegenden Versuch wurden unter 180 Asci 76 mit Postreduktion für *sex* gefunden = 42%, was 21 ME entspricht, für *L/1* 106 Asci = 59% Postreduktion = 29,5 ME. Die Gesamtentfernung zwischen den beiden Loci betrug also rund 50 ME (s. Abb. 3a). Auf dieser langen Strecke kann 3facher Austausch sehr wohl vorkommen, aber ohne dazwischenliegende Merkmale nicht als solcher erkannt werden, da er zu je 50% zu den gleichen Tetradentypen führt wie einfacher und wie doppelter Austausch. Deshalb ist diese Möglichkeit von Wülker gar nicht in Betracht gezogen worden, sondern er versuchte, die Abweichung durch gleichzeitiges Vorkommen von Austausch zwischen Chromatidenstücken und von Postreduktion ganzer Chromatiden zu erklären, war aber von dem Ergebnis seiner Berechnung offenbar selbst wenig befriedigt. Im Gegensatz zu Wülkers eigener Meinung bezeichnete Ludwig (1936) diesen Versuch wegen der exakten Verhältnisse von Prä- und Postreduktion in den verschiedenen Untergruppen geradezu als Beweis für die stete Präreduktion der Spindelfaseransatzstelle. Die ungleichmäßige Beteiligung der Chromatiden blieb aber ungeklärt.

Die von Whitehouse (1956) angegebene Formel zur Berechnung der Häufigkeit von 3fachem Austausch erfordert mindestens 3 Gene, läßt sich daher für den vorliegenden Fall nicht anwenden. Doch ergibt sich ein Anhalt aus der Häufigkeit nichtelterlicher Zweiertypen mit Präreduktion beider Merkmale, entstanden durch 4-Strang-Doppelaustausch in einem der beiden Intervalle. Dieser Fall (Austauschtyp 5) ist 7mal vorgekommen. Sind an Doppelaustausch in einem Intervall 3 Chromatiden beteiligt, so wirkt dies wie einfacher Austausch, 2-Strang-Beteiligung führt zur Ausgangskombination zurück und tritt überhaupt nicht in Erscheinung (Austauschtyp 4). Es ist aber anzunehmen, daß diese Austauschmöglichkeiten im gleichen Verhältnis verwirklicht wurden wie Austauschtyp 5, so daß Doppelaustausch in einem Intervall 7:14:7, im ganzen 28mal aufgetreten sein dürfte. Da die beiden Merkmale 42 und 59, zusammen rund 100% Postreduktion aufweisen, so wird im Mittel etwa zu 50% ein Doppelaustausch auf einer Seite des Zentromers mit einem weiteren Austausch auf der anderen Seite zusammengetroffen sein, d. h. ein solcher 3facher Austausch ist vermutlich in etwa der gleichen Häufigkeit wie alleiniger Doppelaustausch in einem Intervall vorgekommen, also auch etwa 28 mal. Davon wirkt sich die Hälfte wi eeinfacher Austausch aus, nämlich dann, wenn an den beiden Austauschen des einen Intervalls 2 oder 4 Stränge beteiligt sind, die andere Hälfte, mit 3-Strang-Beteiligung, führt wie doppelter Austausch (je 1 auf jeder Seite) zu den Typen mit Postreduktion beider Merkmale. Dabei wird nun die Umkehrung wirksam: Sind die beiden dem Zentromer benachbarten crossing over vom 2- oder 4-Strang-Typ, so entstehen zusammen mit dem 3. Austausch Vierertypen; sind sie aber vom 3-Strang-Typ, so entstehen elterliche und nichtelterliche Zweiertypen in gleicher Häufigkeit.

Nun waren in LINDEGRENs Versuchen bei 3- und 4fachem Austausch die proximal gelegenen Crossover fast ausnahmslos vom 2-Strang-Typ (s. Tabelle 1), und so geht man wohl nicht fehl in der Annahme, daß auch hier in dem Versuch von WÜLKER bei 3fachem Austausch 2-Strang-Beteiligung der proximalen Austausche vorherrschte und daß die in Tetradenklasse 7 (= Vierertypen mit Postreduktion beider Merkmale) überzähligen Tetraden durch solchen 3fachen Austausch entstanden sind. Schließlich muß, da Ereignisse in einem Chromosomenarm unabhängig von denen im andern erfolgen, auch noch eine geringe Zahl 4facher Austausche, je 2 auf jeder Seite, erwartet werden. Von diesen wirkt $^1/_4$ wie einfacher Austausch links (Klasse 4), $^1/_4$ wie einfacher Austausch rechts (Klasse 3), je $^1/_8$ führt zu elterlichen und nichtelterlichen Zweiertypen mit Präreduktion beider Merkmale (Klasse 1 und 2), das letzte Viertel spaltet theoretisch 1:2:1 in die Typen mit Postreduktion beider Merkmale (Klasse 5—7). Bei 2-Strang-Beteiligung der proximalen Austausche würden Klasse 5 und 6 in gleicher Häufigkeit entstehen.

Tabelle 3. *Tetradenklassen von Neurospora sitophila* (WÜLKER 1935), *aufgeteilt nach den verschiedenen Austauschtypen*

| Austausch-typ Nr. | Anzahl Austausche | | Anzahl Asci in den Tetradenklassen | | | | | | | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | li. | re. | 1 P | 2 N | 3 T | 4 T | 5 P | 6 N | 7 T | |
| 1 | 0 | 0 | 27 | | | | | | | 27 |
| 2 | 0 | 1 | | | 43 | | | | | 43 |
| 3 | 1 | 0 | | | | 19 | | | | 19 |
| 6—8 | 1 | 1 | | | | | 8 | 7 | 15 | 30 |
| 4—5 | 0 | 2 | 5 | 5 | 10 | | | | | 20 |
| | 2 | 0 | 2 | 2 | | 4 | | | | 8 |
| | 1 | 2 | | | | 7 | — | — | 7 | 14 |
| | 2 | 1 | | | 7 | | — | — | 6 | 13 |
| | 2 | 2 | 1 | — | 2 | 2 | — | 1 | — | 6 |
| Gesamt | | | 35 | 7 | 62 | 32 | 8 | 8 | 28 | 180 |

Numerierung der Austauschtypen nach WÜLKER (1935),
Numerierung der Tetradenklassen nach WHITEHOUSE (1942):
Klasse 1 und 2 = Präreduktion beider Merkmale,
Klasse 3 = Postreduktion für *L/l*,
Klasse 4 = Postreduktion für *sex*,
Klasse 5—7 = Postreduktion beider Merkmale,
P = elterlicher, N = nichtelterlicher Zweiertyp, T = Vierertyp.

Nach diesen Überlegungen wurden in Tabelle 3 die von WÜLKER in den 7 Tetradenklassen gefundenen Zahlen, die unten als Summe erscheinen, nach den verschiedenen Austauschtypen aufgeteilt. In der 1. Spalte sind die Nrn. der von WÜLKER beschriebenen Austauschtypen 1—8 eingesetzt; 3-Strang-Doppelaustausch in einem Intervall sowie 3- und 4fachen Austausch hatte er nicht berücksichtigt, sondern die betreffenden Tetradentypen den einfacheren Austauschmöglichkeiten 2, 3 und 6—8 zugeordnet.

Analog zu Tabelle 2 sind in Tabelle 4 die Zahlen der letzten Spalte der Tabelle 3 nach dem Auftreten der Austausche im linken bzw. rechten Arm des Chromosoms in ihrem gegenseitigen Zusammentreffen angeordnet.

Tabelle 4. *Kombination von 0, 1 und 2 crossingover im linken Arm mit 0, 1 und 2 crossingover im rechten Arm* (Wülker 1935)

| Anzahl Asci | | | | | | Erwartung, entsprechend den %-Werten | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| li. \ re. | 0 | 1 | 2 | Gesamt | % | 0 | 1 | 2 | Gesamt |
| 0 | 27 | 43 | 20 | 90 | 50,0 | 27,0 | 43,0 | 20,0 | 90,0 |
| 1 | 19 | 30 | 14 | 63 | 35,0 | 18,9 | 30,1 | 14,0 | 63,0 |
| 2 | 8 | 13 | 6 | 27 | 15,0 | 8,1 | 12,9 | 6,0 | 27,0 |
| Gesamt | 54 | 86 | 40 | 180 | | 54,0 | 86,0 | 40,0 | 180,0 |
| % | 30,0 | 47,8 | 22,2 | | 100,0 | | | | |

Die vorgenommene Aufteilung kommt dem tatsächlichen Geschehen zweifellos sehr nahe, denn, wie aus Tabelle 3 und 4 hervorgeht, sind sämtliche Zahlenverhältnisse ideal verwirklicht:

1. Das Verhältnis sowohl der einfachen wie der doppelten Austausche im linken und rechten Arm entspricht dem der Intervall-Längen, wie sie aus der Häufigkeit von Postreduktionen bestimmt waren:

$$\frac{59}{42} = \frac{29{,}5}{21} = \frac{86}{61{,}2} = \frac{40}{28{,}5} = \frac{166}{118}.$$

In der vorstehenden Relation sind im 1. Bruch die prozentualen Häufigkeiten der Postreduktionen, im Zähler für L/1, im Nenner für sex, eingesetzt, im 2. Bruch die sich daraus ergebenden Intervall-Längen, weiterhin im Zähler die aufgetretene Anzahl der einfachen, doppelten und Gesamtaustausche im rechten Arm und im Nenner die nach diesem Verhältnis zu erwartenden Werte für den linken Arm, die mit 63, 27 und 117 fast genau eingehalten sind, der geringe Unterschied geht zu Lasten der Chromosomeninterferenz.

2. Der Anteil von 0, 1 und 2 Austauschen im linken Intervall der laut Tabelle 4 50, 35 und 15% beträgt, hat in jeder der 3 Gruppen von Kombinationsmöglichkeiten mit 0, 1 und 2 Austauschen des rechten Arms fast genau den gleichen Wert, dasselbe gilt für den jeweiligen Anteil von 0, 1 und 2 Austauschen des rechten Intervalls mit 30,0, 47,8 und 22,2%. Dies wird im rechten Teil von Tabelle 4 verdeutlicht, wo die auf Grund dieser Prozentwerte zu erwartenden absoluten Zahlen für die einzelnen Kombinationen eingetragen sind.

3. Die Häufigkeiten von ein- und mehrfachen Austauschen insgesamt wie auch in jedem Arm entsprechen einer Poisson-Verteilung: Im Gesmtbereich sind 0—4 crossingover 27-, 62-, 58-, 27- und 6mal aufgetreten, im linken Arm 0 bis 2 crossingover: 90-, 63- und 27mal, im rechten Arm: 54-, 86 und 40mal.

4. Bei Doppelaustausch entspricht die Beteiligung der Chromatiden der zufälligen Verteilung 1:2:1.

5. Vierfacher Austausch ist, der zufälligen Verteilung der distalen Austausche entsprechend, gleichmäßig auf die 4 Hauptgruppen verteilt, und bei 3fachem Austausch erscheint jeweils die Hälfte in der entsprechenden Vierertyp-Klasse mit Postreduktion nur eines Merkmals (Klasse 3 und 4).

Dagegen ist die andere Hälfte nicht, wie bei Fehlen von Chromatideninterferenz zu erwarten, auf die 3 Klassen mit Postreduktion beider Merkmale verteilt (Klasse 5—7), sondern es treten nur Vierertypen auf. Das bedeutet, daß hierbei die dem Zentromer benachbarten Austausche, die wegen der innerhalb

der Arme wirksamen Chromosomeninterferenz meist nahe an das Zentromer herangerückt sein müssen, stets vom 2- oder 4-Strang-Typ sind, vermutlich überwiegend vom 2-Strang-Typ, doch sind beide Möglichkeiten nicht unterscheidbar.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich also, daß bei Annahme von steter Präreduktion des Zentromers, von negativer Chromatideninterferenz in dessen naher Umgebung und von im übrigen zufälliger Verteilung genau die Zahlen erwartet werden konnten, die von Wülker gefunden worden sind. Somit stimmt dieser Befund in überraschender Weise mit den Ergebnissen von Lindegren und Lindegren (1942) überein und spricht ebenso wie diese und die anderen im vorigen Abschnitt genannten Befunde für negative Chromatideninterferenz in der nächsten Umgebung des Zentromers.

Der oben (S. 410) erwähnte Versuch von Whitehouse (1956) betrifft gleichfalls das Geschlechtschromosom von *Neurospora sitophila* (s. Abb. 3). Auch hier wurde das Geschlechtsmerkmal verwendet, außerdem *pink* im Abstand von 19,3 ME distal von *sex*, und *ginger*, was mit *sex* 42,3% Rekombination zeigte. Durch frühere Untersuchungen mit 3 dazwischenliegenden Merkmalen, darunter das Zentromer, war die Entfernung dieser beiden Loci auf 80,6 ME bestimmt worden; die Gesamtlänge des hier untersuchten Bereichs beträgt also rund 100 ME. *Ginger* wird unweit von Wülkers Merkmal *L/1* liegen, das mit dem Geschlecht 42% Rekombination aufwies und dessen Entfernung von *sex* infolge der vorstehend errechneten 3- und 4fachen Austausche auf 78,6 ME zu korrigieren ist (in 180 Tetraden 283 Austausche = 157,2% = 78,6 ME).

So ließe sich dieser Versuch gut mit dem von Wülker vergleichen, doch verzichtete Whitehouse leider auf das Zentromer als Merkmal, indem er die Tetraden ungeordnet untersuchte. Dadurch ist das Intervall II extrem lang, und es läßt sich nicht ermitteln, was für Austauschvorgänge darin stattgefunden haben. Aus den Anzahlen der fraglichen Tetradentypen mit 7:3:2 kann lediglich geschlossen werden, daß Chromatideninterferenz vorliegt. Whitehouse selbst weist darauf hin, daß bei Verwendung so langer Intervalle lokale Unterschiede nicht ermittelt werden können. Erst durch Wiederholung des Versuchs unter Berücksichtigung von Prä- und Postreduktion könnte klargestellt werden, ob auch dieser Befund so gedeutet werden kann, daß die in Zentromerferne beobachtete negative Chromatideninterferenz nur das Abbild einer nahe dem Zentromer gelegenen 2-Strang-Bevorzugung darstellt, bedingt durch 4fachen Austausch, davon 1 in Intervall I, 3 in II; in dem Versuch von Wülker war 3facher Austausch in dem etwa entsprechenden Chromosomenabschnitt von *sex* bis *L/1* keine Seltenheit (15%).

### C. Positive Chromatideninterferenz

Bevorzugung von 4-Strang-Doppelaustausch ist die einzige Form von Chromatideninterferenz, die, als Rekombinationshäufigkeit von mehr als 50%, in Einzelsträngen erkannt werden kann, doch ist Tetradenanalyse auch hierfür aufschlußreicher.

Durch Injektion von 1% $KNO_3$ in reifende Sporenkapseln von *Funaria hygrometrica* hatte v. Wettstein (1924) erreicht, daß ein Teil der Sporen nach beendeter Meiosis im Tetradenverband verblieb. Diese konnten dann tetradenanalytisch ausgewertet werden. Von 62 Tetraden eines derart behandelten Sporo-

gons, das für 4 gekoppelte Merkmale heterozygot war, waren 35 analysierbar, darunter befanden sich 13 Austauschtetraden verschiedener Kombination, doch waren alles Zweiertypen. Es mußten also an allen vorgekommenen Austauschen alle 4 Chromatiden beteiligt gewesen sein oder der Austausch mußte im 2-Strang-Stadium stattgefunden haben.

Zur Deutung dieses Befundes hat Knapp (1937) darauf hingewiesen, daß bei Genen, die dem Zentromer so nahe liegen, daß sie praktisch fast nie postreduzieren, fast stets nur Zweiertypen entstehen, so daß bei Nichtkoppelung Rekombination fast ausschließlich in Form von Zweiertypen auftreten würde. Im vorliegenden Fall ist aber bei dem starken Überwiegen der elterlichen Kombinationen an der Koppelung aller 4 Merkmale nicht zu zweifeln (22 elterliche Zweiertypen gegenüber 1, 2, 2, 2 und 6 Austauschtetraden der verschiedenen Kombinationen), auch stimmten die Koppelungswerte mit denen einer unbehandelten Nachkommenschaft derselben Kreuzung recht gut überein.

Nun waren aber neben der erwünschten Erhaltung der Tetradenverbände auch noch andere Arten von „Verklebungen" aufgetreten: Das Auseinanderweichen der Chromosomen erfolgte z. T. nicht normal, und es resultierten Sporen mit mehr oder weniger als n Chromosomen; auch kam es vor, daß die 2. Teilung ganz unterblieb und nur 2 bivalente Sporen gebildet wurden, die sich bei Aufzucht stets als homozygot erwiesen. So waren vermutlich die Schwesterchromatiden mehr oder weniger miteinander verklebt, dann konnten nach einem crossing-over die ausgetauschten Stücke nicht normal auseinanderweichen, und das andere Paar mußte notgedrungen ebenfalls austauschen; wenn nicht, dann kam es eben zu Nondisjunktion, Elimination und wohl auch zu nicht lebensfähigen Sporen und Gametophyten, so daß im Endeffekt nur diejenigen Typen heranwuchsen, bei denen alle 4 Chromatiden ausgetauscht hatten. Dabei blieben die Häufigkeitsverhältnisse der verschiedenen Kombinationen gewahrt. Somit handelt es sich hier um einen Artefakt, die scheinbare Chromatideninterferenz war erst durch die Behandlung verursacht worden.

Diese Deutung kann auch für andere Befunde einen Hinweis geben, sie legt nahe, daß 4-Strang-Doppelaustausch immer dann bevorzugt oder ausschließlich auftritt, wenn das Trennen von Schwesterchromatidenstücken in der Meiosis I erschwert ist, was besonders bei Translokationen und Artkreuzungen der Fall sein dürfte.

## Zusammenfassung

1. An Hand bekannter Beispiele aus der Literatur wird gezeigt, daß bei Doppelaustausch in naher Umgebung des Zentromers 2-Strang-Beteiligung vorherrscht, was als mechanisch bedingt erklärt wird.

2. Diagonalaustausch ist nahe dem Zentromer weniger wahrscheinlich als Austausch mit dem benachbart liegenden Chromatid, daher muß 3-Strang-Beteiligung auch gegenüber 4-Strang-Beteiligung zunächst im Nachteil sein. So ergibt sich in nächster Umgebung des Zentromers für die Beteiligung der Chromatiden an Doppelaustausch die Tendenz: 2-Strang-$>$4-Strang-$>$3-Strang-Beteiligung.

3. Diese Art von negativer Chromatideninterferenz ist nur in kurzen, zentromernahen Intervallen direkt zu beobachten (Lindegren und Lindegren 1942,

Knapp und Möller 1955); in Intervallen von mittlerer Länge, wie sie zumeist für genetische Analysen verwendet werden (z. B. Stadler 1955), ist sie zahlenmäßig zu gering und wird z. T. durch einen 3. Austausch ausgeglichen. In langen Intervallen kann 3facher Austausch so häufig sein, daß das Gegenteil resultiert und 3-Strang-Bevorzugung vorgetäuscht wird (Wülker 1935). In sehr langen Chromosomenabschnitten von geeigneter Anordnung endlich kann möglicherweise infolge von 4fachem Austausch wieder 2-Strang-Bevorzugung erscheinen (Whitehouse 1956 ?).

4. Bei niederer Temperatur werden die Austausche zentromerwärts verschoben und dadurch die negative Chromatideninterferenz verstärkt. Gleichzeitig erhöht sich, vermutlich infolge einer geringeren Biegsamkeit der Chromatiden, die positive Chromosomeninterferenz, so daß die Häufigkeit mehrfacher Austausche sowohl innerhalb der Arme als auch über das Zentromer hinweg bei niedriger Temperatur abnimmt.

5. Das ausschließliche Vorkommen von Zweiertypen (= positive Chromatideninterferenz) bei Tetraden von *Funaria hygrometrica* (v. Wettstein 1924) wird als Folge der Behandlung mit $KNO_3$ gedeutet. Durch Verklebung der Schwesterchromatiden war normales Trennen der ausgetauschten Chromatidenstücke unmöglich gemacht, so daß lebensfähige Produkte nur entstehen konnten, wenn beide Paare gleichzeitig austauschten.

6. Es wird vermutet, daß auch bei anderen Beobachtungen von bevorzugtem 4-Strang-Doppelaustausch das Trennen von Schwesterchromatidenstücken durch besondere Umstände erschwert wurde.

## Literatur

Howe jr., H. Branch: Crossing over and nuclear passing in *Neurospora crassa*. Genetics **41**, 622—630 (1956). — Knapp, E.: Crossing-over und Chromosomenreduktion. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **73**, 409—418 (1937). — Knapp, E., u. E. Möller: Tetradenanalytische Auswertung eines 3-Punktversuchs bei Sphaerocarpus Donnellii Aust. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 298—310 (1955). — Lindegren, C. C., and G. Lindegren: Locally specific patterns of chromatid and chromosome interference in *Neurospora*. Genetics **27**, 1—24 (1942). — Lindegren, C. C., and E. E. Shult: The interpretation of genetical data. Experientia (Basel) **13**, 48—51 (1957). — Ludwig, W.: Über die Häufigkeit von Prä- und Postreduktion. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **73** (1937). — Faktorenkoppelung und Faktorenaustausch. Leipzig: Georg Thieme 1938. — Perkins, David D.: Tetrads and crossing over. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl., 2 (1955). — Schmeil-Seybold, O.: Lehrbuch der Botanik, 52. Aufl., Bd. II. Leipzig: Quelle & Meyer 1944. — Shult, E. E., and C. C. Lindegren: Ortho-orientation: A new tool for genetical analysis. Genetica **29**, 58—82 (1957a). — The localized crossover and a new hypothesis of chromosomal interference. Experientia (Basel) **13** (1957b). — Stadler, D. R.: Double crossing over in *Neurospora*. Science **122**, 878—879 (1955). — A map of linkage group VI of *Neurospora crassa*. Genetics **41**, 528—534 (1956a). — Double crossing over in *Neurospora*. Genetics **41**, 623—630 (1956b). — Wettstein, F. v.: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **33**, 1—236 (1924). — Whitehouse, H. L. K.: Crossing over in *Neurospora*. New Phytologist **41**, 23—62 (1942). — The use of loosely-linked genes to estimate chromatid interference by tetrad analysis. C. R. Carlsberg, **26**, 407—422 (1956). — Wülker, H.: Untersuchungen über Tetradenaufspaltung bei *Neurospora sitophila* Shear et Dodge. Z. indukt Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **69**, 210—248 (1935).

Elisabeth Möller, Bad Kösen a. d. Saale, An der Brücke 10

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 421—427 (1959)

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. C. Harte)

# ÜBER DIE AUSLÖSUNG VON SOMATISCHEN MUTATIONEN BEI EPHESTIA KÜHNIELLA Z. DURCH WEICHE UND MITTELHARTE RÖNTGENSTRAHLEN (10—100 kV)*

Von

Ernst-Arnold Löbbecke und Ilse Müller

Mit 2 Textabbildungen

*(Eingegangen am 6. August 1959)*

Schon bald nachdem die mutationsauslösende Wirkung ionisierender Strahlen erkannt war, entstand die Frage nach ihrer Wellenlängenabhängigkeit. Timoféeff-Ressovsky und Zimmer (1935) wiesen an geschlechtsgebundenen Letalfaktoren von *Drosophila* nach, daß in einem breiten Wellenlängenbereich die Mutationsrate unabhängig von der Wellenlänge und der Art der Strahlung ist. Wenn dieses Ergebnis sich auf sichtbare Mutationen übertragen läßt, müßte auch das zahlenmäßige Verhältnis verschiedener Mutationen unabhängig von der Strahlenqualität sein. Einige Arbeiten der letzten Jahre sprechen gegen diese Annahme. Fritz-Niggli (1958) erhielt eine Verschiebung der relativen Mutantenhäufigkeiten am *white*- und *yellow*-Locus von *Drosophila* nach Bestrahlung mit 30 MeV und einer 185 kV-Röntgenstrahlung, konnte sie aber wegen der geringen Mutantenzahlen nicht sichern. Ehrenberg und Nybom (1954) verglichen die mutagene Wirkung von Neutronen und einer 175 kV-Röntgenstrahlung an morphologischen und Chlorophyll-Mutationen der Gerste und fanden Unterschiede im Verhältnis der verschiedenen Mutantengruppen in Abhängigkeit von der Strahlenart. Diese Untersuchungen wurden aber an sehr heterogenem Material und ohne Wiederholungen durchgeführt.

Darum erschien es wünschenswert, die Frage nach der Selektivität der Mutationsauslösung durch wiederholte Versuche und an einem möglichst großen Zahlenmaterial, das sichere statistische Aussagen zuläßt, zu untersuchen. Nach Durchstrahlung weiblicher Raupen und Puppen von *Ephestia kühniella* mit Röntgenlicht treten auf den Hinterflügeln verschiedene, von den normalen gut zu unterscheidende Schuppentypen auf, die von Pohley (1953, 1955) als somatische Mutationen beschrieben wurden. Da auf jedem Flügel im untersuchten Bereich etwa 7000 Schuppen stehen, von denen nach Durchstrahlung der Puppen mit einer mittleren Dosis, die noch keinerlei Zellausfall oder morphologische Veränderungen des Flügels hervorruft, bis zu 30 Schuppen verändert sein können, ist es im Vergleich zu anderen Objekten leicht, ein umfangreiches Material zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob mit der Veränderung des Bremsspektrums von 10—100 kV eine Verschiebung des Mutantenspektrums verbunden ist.

* Die Untersuchung wurde im Auftrag des Sonderausschusses Radioaktivität durchgeführt und vom Ministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft unterstützt.

## Material und Methode

Für unsere Versuche benutzten wir einen Wild-Stamm von *Ephestia kühniella* Z., der seit Jahren in Inzucht gehalten wurde. Die Aufzuchttemperatur betrug 25°C. Nur während der Bestrahlungszeit befanden sich die Tiere bei Raumtemperatur. Das Futter bestand aus Weizenschrot. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Raupen innerhalb von 4—5 Wochen heran. Kurz vor Beginn der Vorpuppenphase, die durch Unruhe der Tiere gekennzeichnet ist, werden möglichst gleich alte weibliche Tiere aus den Zuchtschalen ausgesammelt. Sie kamen zum Einspinnen in große Petrischalen, die etwas feingemahlenes Futter enthielten. An den folgenden Tagen wurden alle 6 Std die frisch verpuppten Tiere herausgesucht und 10 Std später bestrahlt. 10 Tage nach der Bestrahlung schlüpften die Falter. Die Hinterflügel schnitten wir den Tieren nach vorheriger kurzer Betäubung ab und klebten sie mit der Unterseite auf einen mit Caedax bestrichenen Objektträger. Jeder der so behandelten Flügel wurde von 2 Beobachtern getrennt ausgewertet. Anschließend wurden die beide Protokolle nochmals mit dem Flügelpräparat verglichen. Auf diese Weise ließen sich Beobachtungsfehler weitgehend ausschließen.

| kV | mA | Filter | Abstand | r/min |
|---|---|---|---|---|
| 10 | 8 | Be-Eigen-filter | 10 cm | 1200,0 |
| 20 | 10 | 0,15 mm Al | 30 cm | 83,5 |
| 30 | 10 | 0,30 mm Al | 30 cm | 103,0 |
| 45 | 10 | 0,55 mm Al | 30 cm | 112,3 |
| 55 | 10 | 0,78 mm Al | 30 cm | 112,0 |
| 70 | 10 | 1,25 mm Al | 30 cm | 115,4 |
| 85 | 8 | 1,25 mm Al | 30 cm | 122,2 |
| 100 | 8 | 1,70 mm Al | 30 cm | 137,7 |

Es wurden 3 Versuche zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt. Jeder Versuch bestand aus 8 Serien (10, 20, 30, 45, 55, 70, 85, 100 kV) mit je 28 Tieren (56 Flügel). Eine Serie setzte sich aus 1—3 Bestrahlungsgruppen zusammen.

Die technischen Daten waren:

Ein Röntgengerät des Typs RT 100 CHF, Müller, Hamburg, mit einer Oberflächentherapieröhre. Die Röhre hat eine Wolframanode und ein Berylliumfenster.

Die Dosisangabe bezog sich auf Messungen in Luft mit einem Dosimeter des Typs „Ionognom". Die Intensitäten der Strahlungen waren bei allen kV-Stufen mit Ausnahme der 10-kV-Stufe vergleichbar. Bei der 10 kV-Stufe benutzten wir einen Abstand von 10 cm, um die Lufthärtung so gering wie möglich zu halten. Die Dosis betrug in allen Fällen 600 r.

Es war zu erwarten, daß das Chitin des Puparium schon einen beträchtlichen Anteil der sehr weichen 10 kV-Strahlung absorbiert. Dadurch erreicht nur ein Bruchteil der in Luft gemessenen Dosis den Flügel. Um eine Vorstellung vom Ausmaß dieser Dosisminderung zu bekommen, schnitten wir leergequetschte Puparien dorsal auf und bedeckten mit ihnen die Membran der Ionisationskammer unseres Dosimeters (Simplex-Universal-Dosimeter PTW Freiburg). Nur bei der 10 kV-Stufe konnten wir eine filternde Wirkung des Chitins (etwa 10%) feststellen, bei der 30 und 100 kV-Stufe war sie nicht meßbar. Eine weitere filternde Wirkung, die nicht zu messen ist, haben die Vorderflügel, die im Puparium die Hinterflügel bedecken und eine sie umgebende dünne Puppenchitinmembran.

Optische Ausrüstung: Standard-Mikroskope (Zeiss), Objektive: Neofluar 16-, 40fach (ohne Deckglas), Okulare: Kompensationsokulare 8fach, Mikrophotoaufsatz von Leitz.

Die statistische Bearbeitung erfolgte mit Hilfe der $\chi^2$-Zerlegung (Mather 1954).

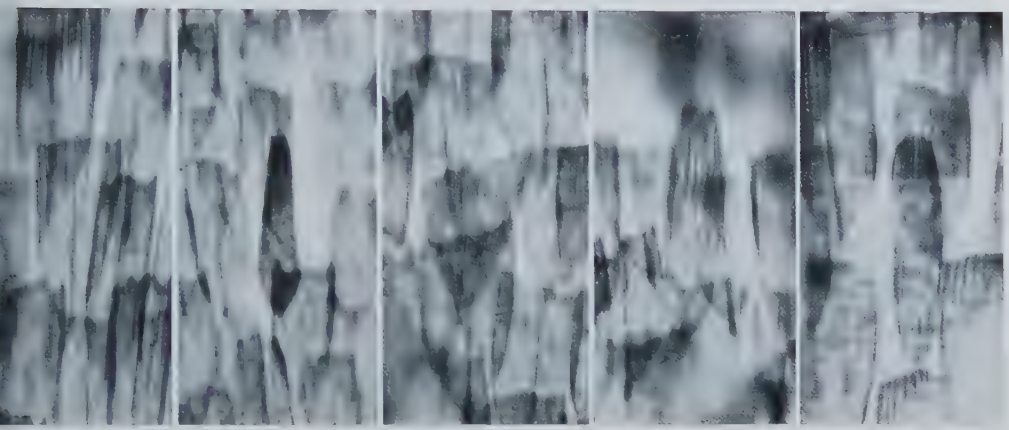
Fräulein M. Althüser, Frl. B. Brunn und Frau S. Distelrath danken wir für die sorgfältige Aufzucht der Tiere und ihre Hilfe bei den Versuchen.

## Ergebnisse

Von den verschiedenen von Pohley (1955) beschriebenen Schuppentypen griffen wir für unsere Untersuchungen die vier häufigsten — ES1, ES2, ES3, ES4 — heraus. Sie kommen fast ausschließlich auf Flügeln der heterogametischen weiblichen Tiere vor und lassen sich deshalb als geschlechtsgebundene Mutationen auffassen. In Abb. 1a—e sind die 4 Schuppentypen neben einer normalen Schuppe dargestellt. ES1 fällt durch ihre bräunliche Farbe und ihre körnige Struktur auf. Als ES2 wird eine fächerförmige Schuppe bezeichnet. Die ES3 hat unregelmäßig verlaufende Rippen, die oftmals durchbrochen sind.

ES4 hat dagegen gerade, eng zusammenliegende Rippen, die an der Spitze zur Mittellinie abgeknickt sein können.

Die Bestrahlungen fanden 10—16 Std nach der Verpuppung statt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Schuppenstammzellen schon fest determiniert. Findet in



a b c d e

Abb. 1a—e. Die Schuppentypen. a Normale Schuppe, b ES1, c ES2, d ES3, e ES4. Vergrößerung etwa 350fach

einer von ihnen eine Mutation statt, kann sie sich nur noch an einer Schuppe auswirken. Da mit dieser Determination auch die Zahl der Schuppen (im untersuchten Flächenbereich zwischen den Adern Radius und $\alpha$ 7000) auf dem Flügel festgelegt wird, gibt die Anzahl der mutierten Schuppen direkt die Mutationsrate an.

In Tabelle 1 sind die Häufigkeiten der einzelnen Mutanten nach Bestrahlungen mit 600 r der verschiedenen kV-Stufen dargestellt. Die 10 kV-Serien fallen

Tabelle 1. *Die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Mutationen in den verschiedenen Serien nach Bestrahlungen mit 600 r*

| | | kV-Stufen | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 | 20 | 30 | 45 | 55 | 70 | 85 | 100 |
| Versuch I | ES 1 | 100 | 273 | 266 | 251 | 257 | 250 | 270 | 260 |
| | ES 2 | 7 | 30 | 14 | 20 | 35 | 21 | 30 | 28 |
| | ES 3 | 13 | 61 | 69 | 50 | 88 | 63 | 104 | 44 |
| | ES 4 | 8 | 21 | 26 | 18 | 29 | 38 | 47 | 25 |
| | Summe | 128 | 385 | 375 | 339 | 409 | 372 | 451 | 357 |
| Versuch II | ES 1 | 84 | 225 | 232 | 242 | 221 | 237 | 225 | 240 |
| | ES 2 | 7 | 19 | 40 | 28 | 18 | 35 | 33 | 38 |
| | ES 3 | 17 | 40 | 40 | 56 | 49 | 60 | 49 | 55 |
| | ES 4 | 7 | 13 | 15 | 31 | 16 | 13 | 20 | 17 |
| | Summe | 115 | 297 | 327 | 357 | 304 | 345 | 327 | 350 |
| Versuch III | ES 1 | 92 | 295 | 312 | 319 | 288 | 268 | 341 | 300 |
| | ES 2 | 8 | 29 | 35 | 20 | 38 | 21 | 26 | 38 |
| | ES 3 | 14 | 82 | 97 | 72 | 83 | 63 | 61 | 70 |
| | ES 4 | 16 | 23 | 33 | 16 | 35 | 18 | 46 | 43 |
| | Summe | 130 | 429 | 477 | 427 | 444 | 370 | 474 | 451 |

durch ihre geringen Häufigkeitszahlen auf. Dieses Ergebnis ist durch eine in dieser Serie vorhandene Dosisminderung zu erklären (s. Material und Methode). Vergleicht man aber die relativen Häufigkeiten der einzelnen Mutanten der 10 kV-Stufe mit denen der höheren kV-Stufen, findet man eine gute Übereinstimmung (Abb. 2).

In dieser graphischen Darstellung sind die prozentualen Anteile der einzelnen Mutanten an der Gesamtmutationsrate in Abhängigkeit von der Härte der Strahlung aufgetragen. Die Werte variieren sehr stark, sowohl zwischen den einzelnen kV-Stufen als auch zwischen den 3 Versuchen. Diese Schwankungen sind anscheinend unabhängig von der Härte der Strahlung.

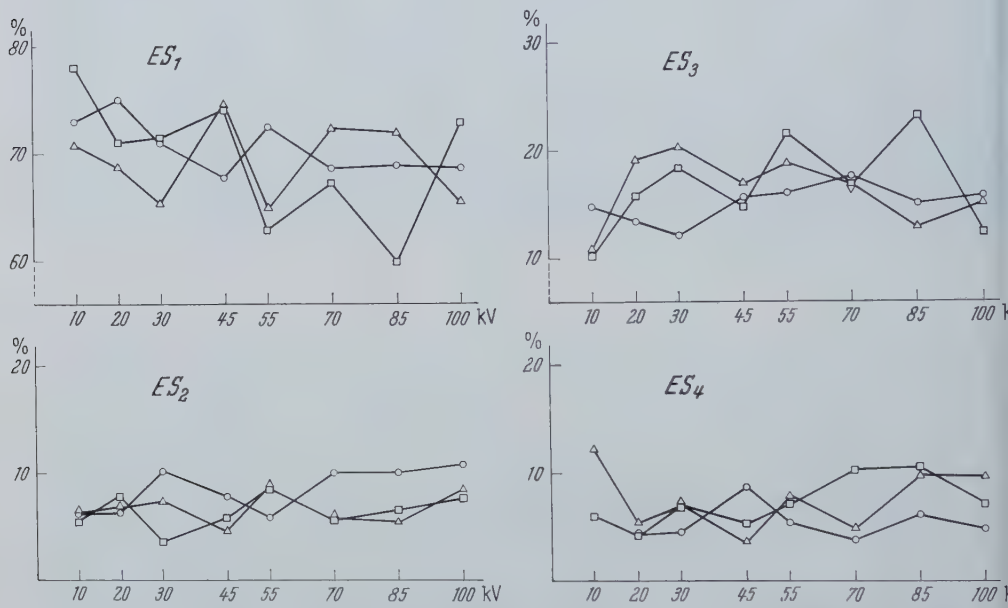



Abb. 2. Die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Mutanten in den 3 Versuchen. Abszisse: Härte der Strahlung (kV-Stufen). Ordinate: Häufigkeit der Mutationen in %. □ 1. Versuch, ○ 2. Versuch, △ 3. Versuch

Die zwischen den Serien eines Versuches im Mutantenspektrum auftretenden Unterschiede lassen sich im $\chi^2$-Test (Allgemeine Zufallstabelle, Mather 1954) erfassen. Für den 1. Versuch z. B. ergibt sich ein $\chi^2$ von 58,739 ($p < 0{,}001$). Die Mutantenspektren der verschiedenen Serien sind also unterschiedlich. Um zu prüfen, ob auch in den Wiederholungen die gleichen Unterschiede auftreten, führten wir eine $\chi^2$-Zerlegung durch. Dieser wurden die absoluten Zahlen der Tabelle 1 zugrunde gelegt, wobei zunächst die abweichenden Werte der 10 kV-Stufe unberücksichtigt blieben. Die Berechnung des $\chi^2$ beruht auf folgender Hypothese: Jeder Mutationstyp habe eine spezifische Mutationsrate, die nur von der Dosis nicht aber von der Härte der Strahlung abhängig sei. Die einzelnen Mutanten müßten also in allen Serien mit der gleichen Häufigkeit erzeugt werden, und die Summe der Mutanten pro Serie müßte ebenfalls gleich sein. Die für diese Erwartung errechneten $\chi^2$-Werte sind in Tabelle 2a—c dargestellt und in ihre Einzelkomponenten zerlegt. (Die eine dieser Komponenten, die „Gleich-

verteilung", gibt Auskunft über die Variabilität der Gesamtmutationsrate, die Komponente der „Homogenität" über die der einzelnen Mutantentypen.) Wie aus Tabelle 2a hervorgeht, ist die Hypothese, daß die Mutanten gleichverteilt sind, nicht zutreffend. Da aber außerdem eine Heterogenität für das Verhalten der einzelnen Mutationstypen in den verschiedenen Versuchen und Serien gut gesichert ist, ist für die Beurteilung der Gleichverteilung nicht das $\chi^2$, sondern ein Varianzenvergleich maßgebend (MATHER 1954). Wie dieser zeigt, sind die Abweichungen von der Gleichverteilung nicht gesichert größer als die Wechselwirkung der kV-Stufen mit den Versuchen (Versuchsfehler), d. h. diese Abweichungen von der Gleichverteilung fallen gegenüber der großen Zufallsstreuung nicht ins Gewicht.

Tabelle 2a—c. *$\chi^2$-Zerlegung.* Berechnet unter der Annahme einer Gleichverteilung für die 3 Versuche mit je 7 Serien (20—100 kV, 600 r). Jede Serie bestand aus 56 Flügeln

| Variationsursache | $\chi^2$ | Fr.Gr. | p | V | F | p |
|---|---|---|---|---|---|---|
| a) Total . . . . . | 387,141 | 80 | | | | |
| Gleichverteilung . . . . | 158,510 | 20 | $<0{,}001$ | 7,926 | 1,742 | 0,2—0,05 |
| Homogenität . . . . . | 228,631 | 60 | $<0{,}001$ | 3,811 | — | |
| b) Homogenität total . . . | 228,631 | 60 | | | | |
| Homogenität zwischen Versuchen . . . . . | 26,890 | 6 | $<0{,}001$ | 4,482 | — | |
| Homogenität zwischen kV-Stufen . . . . . | 37,986 | 18 | $<0{,}001$ | 2,110 | — | |
| Rest (Wechselwirkung kV × Versuch) . . . . | 163,755 | 36 | $<0{,}001$ | 4,549 | | |
| c) Gleichverteilung total . . | 158,510 | 20 | | | | |
| Gleichverteilung zwischen Versuchen . . . . . | 108,810 | 2 | $<0{,}001$ | 54,405 | 18,904 | $<0{,}001$ |
| Gleichverteilung zwischen kV-Stufen . . . . . | 15,170 | 6 | 0,02—0,01 | 2,528 | — | |
| Rest (Wechselwirkung kV × Versuch) . . . . | 34,530 | 12 | $<0{,}001$ | 2,878 | | |

Die Gesamtvariabilität setzt sich zusammen aus der Streuung der Versuche und der Streuung der Serien innerhalb der Versuche.

Aus der Aufgliederung der „Homogenität" in Tabelle 2b ist ersichtlich, daß die einzelnen Mutantentypen sich den Versuchsbedingungen gegenüber gleich verhalten: Die Varianzen für die Unterschiede zwischen den Versuchen und zwischen den kV-Stufen sind im Rahmen zufälliger Abweichungen gleich der Zufallsvarianz.

Zerlegt man die Gesamtvarianz der Gleichverteilung in ihre Komponenten, wie es in Tabelle 2c geschehen ist, lassen sich für die kV-Stufen keine Abweichungen von der Erwartung sichern, wohl aber für die Versuche. Diese gesicherten Unterschiede im Niveau der 3 Versuche sind in Tabelle 1 deutlich zu erkennen. Im 1. Versuch ist die durchschnittliche Mutantenhäufigkeit pro Serie 384, im 2. Versuch liegt sie niedriger (329,6), im 3. Versuch höher (438,9).

Das Hauptergebnis dieser $\chi^2$-Zerlegung ist folgende Aussage: Im Wellenlängenbereich der von 20—100 kV erzeugten Bremsstrahlung sind keine Unterschiede zwischen den gefundenen Mutantenspektren nachweisbar.

Um nun noch zu prüfen, ob das Mutantenspektrum der sehr weichen 10 kV-Strahlung mit dem der härteren Strahlungen übereinstimmt, legten wir einer zweiten $\chi^2$-Analyse die allgemeine Zufallstabelle (Mather 1954) zugrunde. Das daraus berechnete $\chi^2$ gibt Auskunft über die Wahrscheinlichkeit, mit der die relativen Häufigkeiten der einzelnen Mutanten in den 8 kV-Stufen gleich sind. Der Varianzenvergleich (Tabelle 3) zeigt sowohl zwischen den kV-Stufen als auch

Tabelle 3. $\chi^2$-*Analyse.* Berechnet auf Grund der allgemeinen Zufallstabelle für die Mutantenspektren, nach Bestrahlungen mit 600 r der kV-Stufen 10—100

| Variationsursache | $\chi^2$ | Fr. Gr. | P | V | F | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Total . . . . . | 171,900 | 69 | | | | |
| Zwischen kV-Stufen | 46,133 | 21 | 0,01—0,001 | 2,197 | 1,07<br>2,07 | $>0{,}2$<br>0,1 |
| Zwischen Versuchen | 27,220 | 6 | $<0{,}001$ | 4,537 | 1,93 | 0,2—0,1 |
| Reste . . . . . | 98,547 | 42 | | 2,346 | | |

zwischen den Versuchen keinen sicheren Unterschied. (Die Homogenität der 3 Versuche erklärt sich daraus, daß bei dieser Art der $\chi^2$-Berechnung die Differenzen in der absoluten Häufigkeit der Mutanten keine Rolle spielen.) Das Mutantenspektrum der 10 kV-Stufe unterscheidet sich also nicht von dem der anderen kV-Stufen.

## Schlußbetrachtung

Betrachtet man jeden der 3 Versuche für sich, dann kann man einen Unterschied zwischen den Mutantenspektren der 8 kV-Stufen statistisch einwandfrei sichern. Bei der Zusammenfassung der Wiederholungen ergibt sich aber, daß diese Differenzen nicht auf die unterschiedlichen Strahlenqualitäten, sondern auf die große Zufallsstreuung zurückzuführen sind. Diese rein zufälligen Unterschiede bestehen sowohl in den Gesamtmutationsraten der Serien als auch im Verhältnis der Mutationstypen untereinander.

Diese starke Variabilität ist nicht leicht erklärbar. Die Aufzucht und Behandlung der Tiere erfolgte unter sehr konstanten Bedingungen. Wie Pohley und Esser (1958) nachwiesen, hat das Alter der bestrahlten Tiere einen Einfluß auf die Mutationsrate. Die von ihnen gefundene Abnahme der Mutationshäufigkeit beginnt aber erst 36 Std nach der Verpuppung. Deshalb dürfen wir annehmen, daß unsere 10—16 Std alten Versuchstiere homogen hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit sind. Da unter den in allen Versuchen konstant gehaltenen Aufzuchtbedingungen unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten nicht beobachtet wurden, liegen Ungenauigkeiten der Altersbestimmung, welche Ursache der gefundenen Differenzen sein könnten, nicht vor. Für die starken Schwankungen der Mutationshäufigkeiten müssen bisher noch unbekannte äußere und innere Faktoren verantwortlich sein.

Aus den Untersuchungen geht hervor, wie wichtig die Erfassung der Zufallsstreuung für die Beurteilung von Unterschieden in der relativen biologischen Wirksamkeit verschiedener mutagener Agentien ist.

Frau Prof. Dr. C. Harte danken wir für die stete Unterstützung, ihr Interesse an der Arbeit und ihren Rat in statistischen Fragen, Herrn Dr. H. J. Pohley für manche Diskussionen.

**Summary**

Experiments were carried out to investigate the effects of different wavelengths of X-rays (10—100 kV, 600 r) on four somatic mutations of the scales on the hind wings of Ephestia kühniella Z.

We made three experiments at different times. Each consisted of eight groups for the different voltages of the X-rays.

The mutation rates and the relative frequencies of the four mutations were compared.

There are no correlations between the mutational spectrum and the qualities of X-rays.

The variations between each group of one experiment and between the three experiments are great. It cannot be said which factors may be responsible for this variability.

**Literatur**

Ehrenberg, L., and N. Nybom: Ion density and biological effectiveness of radiations. Actaagricult. scand. **4**, 396—418 (1954). — Fritz-Niggli, H.: Abhängigkeit der Mutationsentstehung von der Strahlenqualität (30 MeV-Elektronen, 3 MeV-Photonen und 180 kV-Photonen). Naturwiss. **45**, 117—118 (1958). — Mather, K.: Statistische Analysen in der Biologie. Wien: Springer 1954. — Pohley, H. J.: Untersuchungen über differentielle Zellteilungen und somatische Mutationen am Schuppenkleid der Mehlmotte Ephestia kühniella Z. Biol. Zbl. **72**, 577—598 (1953). — Über die somatische Mutabilität bei Ephestia kühniella Z. Biol. Zbl. **74**, 474—480 (1955). — Pohley, H. J., u. H. Esser: Über das Verhalten mutanter Schuppen auf den Hinterflügeln der Mehlmotte Ephestia kühniella nach Puppenbestrahlungen. Z. Vererb.-Lehre **89**, 707—714 (1958). — Timoféeff-Ressovsky, N. W., u. K. G. Zimmer: Wellenlängenunabhängigkeit der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgen- und Gamma-Strahlung bei Drosophila melanogaster. Strahlentherapie **54**, 265—278 (1935).

Dr. Ernst-Arnold Löbbecke und Dr. Ilse Müller,
Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 428—444 (1959)

Aus der Abteilung Strahlenbiologie, Institut für Genetik (im Aufbau) der Universität Köln *

# UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE EINES DIE UV-EMPFINDLICHKEIT BESTIMMENDEN GENS DER BAKTERIOPHAGEN T2 UND T4

Von

Walter Harm

Mit 7 Textabbildungen

*(Eingegangen am 14. September 1959)*

## A. Einleitung

T2 und T4 gehören zu den genetisch bestuntersuchten Bakteriophagen. Sie sind morphologisch nicht unterscheidbar und besitzen etwa gleichen Gehalt an Desoxyribonukleinsäure (DNS), die sich qualitativ von der üblichen DNS in dem Vorhandensein von glucosesubstituiertem 5-Hydroxy-Methyl-Cytosin (an Stelle von Cytosin) unterscheidet. Beide Phagentypen sind serologisch und genetisch verwandt, d. h., sie reagieren — wenn auch abgeschwächt — mit dem heterologen Antiserum und zeigen untereinander genetische Rekombination. Verschiedene andere Eigenschaften, wie Lysis-Inhibition, Empfindlichkeit gegenüber osmotischem Schock oder Ultraschall, sind beiden gemeinsam. Auch die Empfindlichkeit gegen die inaktivierende Wirkung von zerfallenden, in die DNS eingebauten P32-Atomen sowie die Röntgenempfindlichkeit ist bei T2 und T4 übereinstimmend.

Wesentliche Unterschiede bestehen neben dem Wirtsbereich vor allem in der UV-Empfindlichkeit und einigen mit der UV-Inaktivierung zusammenhängenden Erscheinungen. Man erhält mit T2 und T4 etwa gleiche Überlebensprozentsätze, wenn sich die eingestrahlten UV-Dosen wie 1:2 verhalten; T2 ist also etwa doppelt so empfindlich wie T4. Luria (1949) fand in Kreuzungen zwischen T2 und T4, daß unter den dem Wirtsbereich nach T2-artigen und T4-artigen Individuen der Nachkommenschaft jeweils beide Empfindlichkeitsstufen vertreten waren, d. h., die UV-Empfindlichkeit erwies sich als ein rekombinierbares genetisches Merkmal. Streisinger (1956) konnte kreuzungsgenetisch feststellen, daß der UV-Empfindlichkeits-Locus eng mit dem Locus $r_{17}$ von T2 (Stamm Luria) gekoppelt ist. Da außer den beiden Empfindlichkeiten keine Zwischenstufen auftraten, handelt es sich offenbar um ein einziges Gen. Weiterhin zeigte sich, daß dieses Gen auch das Ausmaß der Photo-Reaktivierbarkeit bestimmt, das bei T2 und T4 unterschiedlich ist. Unter Bedingungen maximaler Photo-Reaktivierung (PhR) werden bei T2 56% der letalen UV-Treffer revertiert, bei T4 dagegen nur 20% (Dulbecco 1950). Nach Streisinger haben Phagen mit der UV-Empfindlichkeit von T2 (bzw. T4) auch stets die Photo-Reaktivierbarkeit von T2 (bzw. T4); er bezeichnete das normalerweise in T2 vorhandene Allel als $u^+$ und das in T4 vorhandene als $u$.

* Ein größerer Teil der Experimente wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt a. M. durchgeführt, die Kreuzungsreaktivierungs-Experimente am California Institute of Technology, Division of Biology, Pasadena, California.

Bei dieser Sachlage erschien die Frage sinnvoll, auf welche Weise das Gen den Empfindlichkeitsunterschied bestimmt. Die Beantwortung wäre nicht nur im Hinblick auf die Genphysiologie von Phagen-Bakterien-Systemen interessant, sondern könnte als Modellfall auch von allgemeinerem Interesse für die Strahlenbiologie sein. Weiterhin erschien es möglich, auf diese Weise auch der Deutung anderer, mit der UV-Inaktivierung zusammenhängender Phänomene näherzukommen, die bei T2 und T4 unterschiedliches Ausmaß haben, wie z. B. die Multiplizitäts-Reaktivierung (Luria und Dulbecco 1949).

Theoretische Erwägungen auf Grund der bisher bekannten experimentellen Befunde haben zu einer Reihe von Experimenten Anlaß gegeben, deren Ergebnisse im folgenden mitgeteilt werden sollen[1]. Im Zusammenhang damit wird in der Diskussion versucht, eine Vorstellung bezüglich der quantitativen Aufgliederung der UV-Empfindlichkeit innerhalb des Genoms der Phagen T2 und T4 zu gewinnen, die geeignet ist, die bekannten Unterschiede in den UV-Phänomenen verständlich zu machen.

## B. Material und allgemeine Versuchsmethodik

Für die Experimente wurden die Phagen T2 (Luria) und T4 (Doermann) sowie die Stämme $\overline{T2}u^+h^+r_{22}^+$, $\overline{T2}uh^-r_{22}^+$, $\overline{T2}u^+hr_{22}$ und $\overline{T2}uhr_{22}$ (Streisinger und Weigle 1956) benutzt[2]. Die $\overline{T2}$-Stämme stammen aus Kreuzungen T2 × T4 und wurden von Streisinger 9mal mit dem T2-Elter unter Selektion bestimmter Genotypen rückgekreuzt. Sie dürften, abgesehen von den selektierten Markern, weitgehend isogen sein. Als Indikatorbakterien wurde im allgemeinen *Escherichia coli B* verwendet, außerdem in verschiedenen Experimenten Unterstämme von *E. coli K 12 (λ)* zur Selektion der $r_{22}^+$-Phagen bei gemischter Infektion mit $r_{22}$.

Zur UV-Bestrahlung dienten Hg-Niederdrucklampen (im allgemeinen Osram HNS 12, in den Kreuzungsreaktivierungs-Experimenten eine General Electric Germicidal Lamp), die an wirksamer UV-Strahlung fast ausschließlich die Linie 2537 Å emittieren. Als Dosismaß diente jeweils die Zeitdauer der Bestrahlung (bei konstanter Intensität), die in den Abbildungen als Abszisse aufgetragen ist. Bei den Abb. 6 und 7 ist jedoch der Maßstab untereinander und mit den übrigen Abbildungen nicht vergleichbar, da die Untersuchungen in verschiedenen Labors durchgeführt wurden. Deshalb ist bei diesen beiden Abbildungen auf die Angabe „min" bzw. „sec" verzichtet worden. Außer bei Photo-Reaktivierungs-Experimenten wurde stets bei schwachem Gelblicht gearbeitet. Maximale Photo-Reaktivierung wurde durch 30 min Belichtung mit U-förmigen Osram-Leuchtstoffröhren, Typ HNW 72, 16 W, erreicht. Spezielle Versuchsbedingungen werden jeweils an entsprechender Stelle im Text mitgeteilt; die allgemeine Arbeitsmethodik entsprach den Angaben bei Adams (1959).

## C. Zur Wirkungsweise des *u*-Gens

Die in der Einleitung genannten experimentellen Tatsachen lassen hinsichtlich der Wirkungsweise des *u*-Allels folgende prinzipielle Denkmöglichkeiten zu:

1. In der DNS des *u*-Phagen sind bereits die UV-ausgelösten photochemischen Primärveränderungen qualitativ oder quantitativ verschieden von denen in der DNS des $u^+$-Phagen, was zu dem genannten Empfindlichkeitsunterschied führt.

[1] Einige vorläufige Ergebnisse waren bereits als kurze Originalmitteilung publiziert worden (Harm 1958).

[2] Für die Überlassung der $\overline{T2}$-Stämme bin ich Herrn Dr. G. Streisinger, Dept. of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbor, N.Y., zu großem Dank verpflichtet.

2. Die UV-ausgelösten Primärveränderungen in der DNS sind bei $u$- und $u^+$-Phagen gleich; die unterschiedlich hohe UV-Inaktivierung beruht nur darauf, daß infolge der genphysiologischen Wirkung des $u$-Allels sich eine Anzahl von Primärveränderungen des DNS-Moleküls nichtletal auswirken, die ohne die Anwesenheit des $u$-Allels (d. h. bei Vorhandensein des $u^+$-Allels) für den Träger letal wären.

Im Falle der Möglichkeit (1) könnte man entweder (1a) annehmen, daß sich eine solche unterschiedliche Primärempfindlichkeit auf die gesamte DNS erstreckt, oder (1b) daß sie nur einen kleinen Teil davon betrifft. Die letztere Möglichkeit wurde bereits von STREISINGER (1956) unter Hinweis auf die Theorie der Multiplizitäts-Reaktivierung von BARRICELLI (1956) diskutiert, nach der es in der strahlenempfindlichen Substanz einige besonders empfindliche Regionen, sog. „vulnerable centers", gibt. Nähme man an, daß der UV-Empfindlichkeitsunterschied zwischen T2 und T4 vorwiegend in solchen „vulnerable centers" liegt, so könnte man leicht verstehen, daß die Gesamtmenge DNS beider

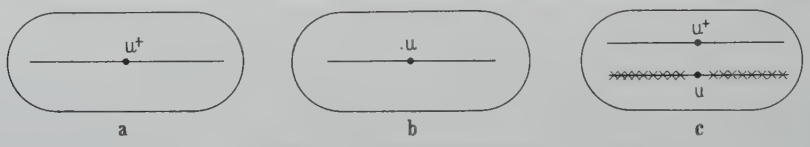



Abb. 1a—c. Schema der Versuchsanordnung (vgl. Text)

Phagen nicht merklich unterschiedlich zu sein braucht. Eine Konkretisierung der Möglichkeit (1a) könnte man in der Tatsache sehen, daß ein geringfügiger *qualitativer* Unterschied zwischen der T2- und T4-DNS besteht: Bei ersterer ist nur etwa 77% des 5-Hydroxy-Methyl-Cytosins mit Glucose substituiert, bei letzterer 100% (SINSHEIMER 1956). Hierin kann jedoch nicht die Ursache für die unterschiedliche UV-Empfindlichkeit liegen, da nach Ergebnissen von STREISINGER und WEIGLE (1956) die Nachkommen aus T2 × T4-Kreuzungen 100%ig glucosesubstituiertes 5-Hydroxy-Methyl-Cytosin besaßen, unabhängig davon, ob das $u$- oder $u^+$-Allel vorhanden war. Im Falle der Möglichkeit (2) könnte man insbesondere denken, daß die Anwesenheit des $u$-Allels in der Zelle den Ablauf physiologischer Prozesse bewirkt, die einen großen Teil (etwa 50%) der sonst letalen Schäden in einen Zustand rück- oder weiterverwandeln, der sich für den Träger nicht mehr letal auswirkt (= „Reaktivierung").

Der grundsätzliche Unterschied zwischen Möglichkeit (1) und (2), der gleichzeitig eine experimentelle Behandlung des Problems gestattet, ist folgender: Im Falle (1) muß die geringer UV-empfindliche Phagen-DNS notwendigerwiese selbst das $u$-Allel enthalten, während im Falle (2) ein funktionsfähiges $u$-Allel zwar in der gleichen Bakterienzelle, nicht notwendigerweise aber in der geringer empfindlichen Phagen-DNS selbst enthalten zu sein braucht. Eine Situation, die geeignet erscheint, zwischen diesen beiden Möglichkeiten experimentell zu unterscheiden, ist in Abb. 1 schematisch wiedergegeben. Die UV-bestrahlten Phagen überleben im Falle (a) gemäß der für T2 charakteristischen, steiler abfallenden Überlebensfunktion, im Falle (b) gemäß der weniger steil abfallenden Überlebensfunktion, die für T4 kennzeichnend ist. Im Falle (c) ist in der Zelle außer dem $u^+$-Phagen, der für sich allein nach der T2-Funktion überleben müßte, ein sehr stark UV-inaktivierter $u$-Phage vorhanden, dessen eigenes Überleben vernachlässigbar

gering ist. Da das $u$-Gen vermutlich recht klein ist gegenüber der Gesamtheit des UV-empfindlichen Materials der Phagen, dürfte selbst bei einer sehr hohen UV-Dosis die Wahrscheinlichkeit nicht allzu klein sein, daß das $u$-Gen ungeschädigt bleibt. Wenn das Überleben der $u^+$-Phagen bei der Anordnung (c) T2-artig ist, so spricht dies für das Zutreffen der Möglichkeit (1); ist das Überleben dagegen T4-artig, so schließt es die Möglichkeit (1) einwandfrei aus.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse von Versuchen, in denen das Überleben von Phagen gemäß der Anordnung (c) geprüft wurde. Die experimentellen Bedingungen hierfür waren folgende: Wachsende Zellen von E. coli B wurden in einer durchschnittlichen Infektions-Multiplizität[1] von $m \approx 10^{-3}$ mit den auf ihre UV-Überlebensfunktion zu prüfenden T2-Phagen infiziert und gleichzeitig mit extrem stark UV-inaktivierten T4-Phagen mit $m \approx 3$. Da die Verteilung der infizierenden Phagen auf die Zellen in erster Näherung zufallsgemäß ist, mußten die überhaupt T2-infizierten Zellen in nahezu allen Fällen (theoretisch in dem Bruchteil $\frac{m e^{-m}}{1 - e^{-m}}$ der Fälle) nur von einem einzigen T2-Partikel infiziert sein, so daß Multiplizitäts Reaktivierung (Luria und Dulbecco 1949) zwischen UV-inaktivierten T2-Partikeln im Dosisbereich bis zu etwa $10^{-3}$ Überlebenden keine merkliche Rolle spielen konnte. Andererseits gewährleistete die Multiplizität 3 der stark inaktivierten T4-Phagen, daß die große Mehrzahl der T2-infizierten Zellen (d. h. etwa der Bruchteil $1 - e^{-3}$) auch mindestens 1 T4-Phagen enthielt. Obwohl unter diesen Bedingungen der Bruchteil der von *mehreren* T4-Partikeln infizierten Zellen unter den überhaupt T4-infizierten Zellen relativ hoch ist, nämlich etwa 0,85, war bei der verwendeten sehr hohen UV-Dosis (5 min Bestrahlungsdauer, das sind durchschnittlich 70 Letaltreffer pro Phage) die Multiplizitäts-Reaktivierung so gering, daß sie vernachlässigt werden konnte oder nur ganz geringfügige Korrekturen notwendig machte, wie sich aus den experimentellen Kontrollen ergab. In Abb. 2 wird die Überlebenskurve der T2-Partikel bei gleichzeitiger Anwesenheit stark inaktivierter T4-Partikel durch die Kurve III wiedergegeben. Zum Vergleich ist die reine T2-Überlebenskurve (Kurve I) und die

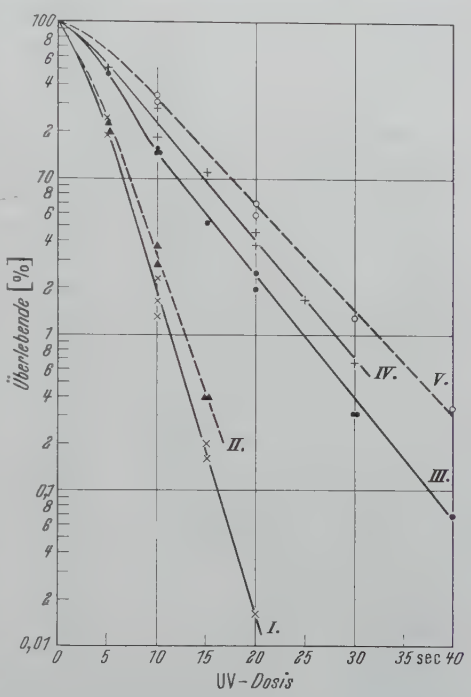



Abb. 2. Überlebenskurven von T2 und T4 unter variierten Versuchsbedingungen (vgl. Text). Kurve *I* (×): T2; Kurve *II* (▲): T2 (+5 min UV-inaktivierte T2); Kurve *III* (●): T2 (+5 min UV-inaktivierte T4); Kurve *IV* (+): T4; Kurve *V* (○): T4 (+5 min UV-inaktivierte T4)

[1] Als durchschnittliche Infektions-Multiplizität ($m$) wird das Verhältnis der Zahl adsorbierter Phagen zur Zahl der vorhandenen Bakterienzellen im Adsorptionsgemisch bezeichnet.

reine T4-Überlebenskurve (Kurve IV) dargestellt. Wie ersichtlich, entspricht die endgültige Neigung der Kurve III nahezu völlig der der Kurve IV.

Obwohl sich experimentell zeigen ließ, daß die Multiplizitäts-Reaktivierung (MR) zwischen den stark inaktivierten T4-Partikeln zu vernachlässigen ist gegenüber den Überlebenswerten der T2-Partikel, könnte der Einwand gemacht werden, daß zwischen den stark inaktivierten T4-Phagen einerseits und den mit durchschnittlich nur wenigen UV-Treffern inaktivierten T2-Phagen andererseits die MR stärker sei und möglicherweise an der flacheren Neigung der Kurve III gegenüber Kurve I maßgeblichen Anteil habe. Deshalb wurden zur Kontrolle Versuche durchgeführt, in denen die auf ihr Überleben zu prüfenden T2-Phagen mit stark inaktivierten T2 (gleiche UV-Dosis wie bei den stark inaktivierten T4) infiziert wurden (Kurve II) und die auf ihr Überleben zu prüfenden T4-Phagen mit stark inaktivierten T4 (Kurve V). Die geringe Divergenz zwischen den Kurven I und II sowie den Kurven IV und V läßt erkennen, daß unter diesen Umständen ein gewisser MR-Effekt vorhanden ist; es werden in beiden Fällen noch etwa 15% der sonst letalen Treffer auf diese Weise reaktiviert. Die Konstanz dieses Prozentsatzes im hier geprüften Dosisbereich entspricht durchaus der Erwartung, weil die UV-Dosis nur bei einem der MR-Partner variiert wurde, im Gegensatz zu den üblichen MR-Experimenten, bei denen die Strahlendosis jeweils für alle MR-Partner in gleicher Weise variiert wird.

Aus den letztgenannten Befunden folgt eindeutig, daß die T4-artige Neigung der Kurve III *nicht* durch MR verursacht sein kann. Somit läßt sich auf Grund des Kurvenverlaufes die eingangs genannte *Deutungsmöglichkeit (1) einwandfrei ausschließen*; vielmehr muß angenommen werden, daß der Grad der UV-Empfindlichkeit erst sekundär durch die Anwesenheit des *u*-Allels bestimmt wird. Als spezielle Erklärung kommt in allererster Linie in Frage, daß das *u*-Allel auf dem Wege über zelluläre stoffliche Reaktionen eine Reaktivierung von Letalschäden bewirkt, und zwar entweder durch echte Reversion der eingetretenen photochemischen Effekte oder durch eine nichtletale Weiterveränderung der betroffenen Nukleotide. Andere denkbare Erklärungsmöglichkeiten, z. B., daß das *u*-Gen die Funktion zahlreicher anderer Gene ersetzt und damit den Wirkungsquerschnitt des strahlenempfindlichen Materials verringert, sind nach den im folgenden mitgeteilten Ergebnissen äußerst unplausibel.

Wenn die obige Deutung zutrifft, so sollte man erwarten, daß die nach der T4-Funktion überlebenden T2-Phagen genetisch $u^+$ bleiben, so daß sich die Nachkommenschaft hinsichtlich der UV-Empfindlichkeit wie typische T2-Phagen verhalten müßte.

Um dies zu prüfen, wurden von den bei der höchsten Dosis der Kurve III überlebenden Phagen 10 etwa gleich große Einzel-Plaques gemeinsam in Pufferlösung resuspendiert, Bakterien und Agarreste abzentrifugiert und die Phagen-Suspension erneut einer UV-Bestrahlung ausgesetzt. Dabei ergab sich bis zu einer Überlebensrate von $10^{-3}$ kein Unterschied zur typischen T2-Überlebenskurve. Wäre nur einer der 10 Plaques genotypisch *u* gewesen, so hätte sich dies bereits im Bereich von $10^{-2}$ durch ein deutliches Abknicken der Überlebenskurve bemerkbar machen müssen. Das Ergebnis zeigt demnach, daß alle oder nahezu alle nach der T4-Funktion überlebenden Phagen genotypisch $u^+$ sind.

### D. UV-Empfindlichkeit des *u*-Gens selbst

Wenn die bisher gezogenen Schlußfolgerungen zutreffen, so sollte die Lage der Kurve III in bestimmter Weise durch die Dosis für die stark inaktivierten T4-Phagen beeinflußt werden: Steigert man die an sich schon sehr hohe Dosis, so müßten ja mit zunehmender Wahrscheinlichkeit solche Komplexe auftreten, die zwar einen oder mehrere *u*-Phagen haben, bei denen jedoch das *u*-Gen selbst durch die UV-Bestrahlung funktionsunfähig geworden (d. h. inaktiviert worden) ist.

Es wurden deshalb außer den in Abb. 2 wiedergegebenen Experimenten, bei denen die Bestrahlungsdauer für die stark zu inaktivierenden T4-Partikel 5 min betrug, Experimente mit 7, 9 und 10 min Bestrahlungsdauer durchgeführt. Die Anwendung noch höherer Bestrahlungszeiten war aus methodischen Gründen nicht möglich.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Wie ersichtlich, resultieren aus der Steigerung der UV-Dosis zunehmend geknickte Überlebenskurven, deren flacherer Teil systematisch nach tieferen Werten hin parallel verschoben ist. Die geknickten Kurven müssen als eine Überlagerung einer T2-Überlebensfunktion mit einer T4-Überlebensfunktion angesehen werden; der Bruchteil der nach der T4-Funktion überlebenden Komplexe ergibt sich aus der Extrapolation (gestrichelt gezeichnet) des flacheren Kurventeils auf die Dosis Null (Schnittpunkt mit der Ordinate), relativ zum Extrapolationswert der reinen T4-Überlebenskurve (etwa 1,3).

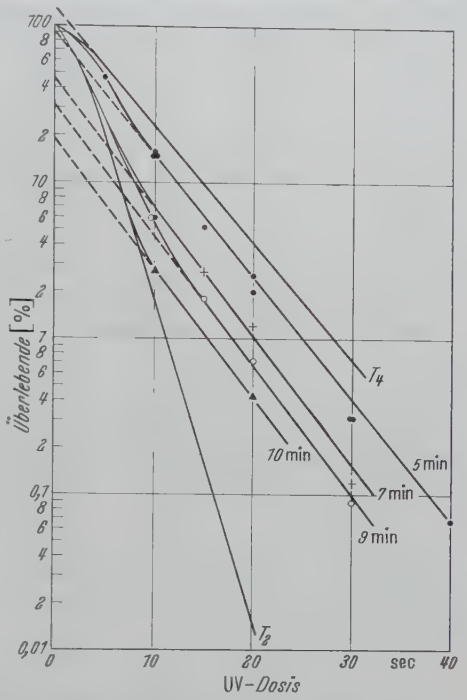



Abb. 3. Überlebenskurven von T2, bei Anwesenheit stark inaktivierter T4 im Komplex, im Vergleich zur reinen T2- und T4-Überlebenskurve. Die als Parameter angegebenen Minutenzahlen bedeuten die UV-Dosis für die stark inaktivierten T4-Phagen. Die 5 min-Werte sind identisch mit denen in Abb. 2

In Abb. 4 ist der Bruchteil der nach der T4-Funktion überlebenden Komplexe in Abhängigkeit von der UV-Dosis aufgetragen. Da in diesen Komplexen mindestens 1 *u*-Gen funktionsfähig sein muß, stellen die Werte gleichzeitig die Überlebensprozentsätze für mindestens 1 *u*-Gen je Komplex dar. Die Lage der Punkte ist in gutem Einklang mit einer 3-Treffbereichs-Funktion $N/N_0 = 1-(1-e^{-KD})^3$, wie man sie bei einer durchschnittlichen Multiplizität von 3 zu erwarten hat unter der Annahme, daß die einzelnen *u*-Gene im Komplex unabhängig voneinander je nach einer Eintreffbereichs-Funktion inaktiviert werden. Die Neigung des geradlinigen Teils der Kurve beträgt nur etwa 0,9% der Neigung des geradlinigen Teils der T2-Überlebenskurve. Der methodisch bedingte sehr begrenzte Dosisbereich von 5—10 min, in dem die 4 Kurvenpunkte liegen, schränkt naturgemäß die Genauigkeit des angegebenen Neigungswertes ein, es

wären eventuell auch noch Neigungen von 0,7 oder 1,1% mit den Kurvenpunkten verträglich. *Somit kann die UV-Empfindlichkeit des u-Gens selbst, relativ zur Empfindlichkeit des Gesamtphagen, mit etwa (0,9 ± 0,2)% angegeben werden.*

Daß hierbei die UV-Empfindlichkeit des *u*-Gens mit der UV-Empfindlichkeit des T2-Phagen (und nicht mit der des T4-Phagen) verglichen wird, liegt in der Überlegung begründet, daß ja UV-Treffer im *u*-Gen selbst nicht mehr durch die postulierten, vom *u*-Gen initiierten physiologischen Prozesse reaktiviert werden können. Will man also aus der relativen Empfindlichkeit eines bestimmten Bereichs auf seine relative Größe schließen (was u. U. bei UV recht problematisch ist), so muß man die UV-Empfindlichkeit des *u*-Gens mit der T2-Empfindlichkeit vergleichen. Die daraus folgende Größe von etwa 0,9% des Gesamtgenoms ist dabei nicht unplausibel.

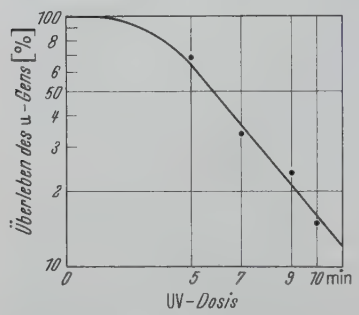



Abb. 4. Überleben des *u*-Gens als Funktion der UV-Dosis. Die Punkte stellen die Extrapolationswerte dar, die sich aus den Kurven für 5, 7, 9 und 10 min UV der Abb. 3 ergeben, im Verhältnis zu dem Extrapolationswert der reinen T4-Kurve

Gegen diese Berechnung der relativen Empfindlichkeit des *u*-Gens könnte der Einwand erhoben werden, daß die zugrunde gelegte Kurvenneigung in Abb. 4 lediglich den Prozentsatz der T4-Phagen wiedergibt, der bei der jeweiligen UV-Dosis noch in der Lage ist, zu reaktivieren. Bei den hierzu nicht mehr fähigen T4-Phagen braucht aber nicht notwendigerweise das *u*-Gen selbst inaktiviert zu sein, sondern sie könnten z. B. Schädigungen erhalten haben, die eine Injektion ihres genetischen Materials in die Bakterienzelle verhindern, oder ähnliches mehr. Bei Zutreffen dieses Einwandes wäre die errechnete relative UV-Empfindlichkeit nur als Maximalwert anzusehen.

Dem ist entgegenzuhalten, daß in Kreuzungsreaktivierungs-Experimenten mit $T_4$ (DOERMANN u. Mitarb.; zitiert bei KRIEG 1959) die endgültige Neigung der Marker-Überlebenskurve nur etwa $^1/_{140}$ der Neigung der T4-Überlebenskurve beträgt. Die Wahrscheinlichkeit für Injektionsverhinderung kann also im Höchstfalle $^1/_{140}$ der T4-Inaktivierungswahrscheinlichkeit sein. Da die Kurvenneigung in Abb. 4 jedoch 0,9% ($=^1/_{110}$) der T2-Empfindlichkeit oder $^1/_{55}$ der T4-Empfindlichkeit entspricht, kann sie höchstens zum geringeren Teil durch das Eindringvermögen oder ähnliches bestimmt sein, so daß dadurch der angegebene Wert für die *u*-Gen-Empfindlichkeit nicht wesentlich verändert würde.

### E. Photo-Reaktivierung der durch das *u*-Gen reaktivierbaren UV-Letalschäden

Wie bereits STREISINGER (1956) experimentell feststellte, kontrolliert das *u*-Gen nicht nur den Grad der UV-Empfindlichkeit, sondern auch den Grad der Photo-Reaktivierbarkeit. Vergleicht man Angaben über die PhR von T2 und T4 (z. B. DULBECCO 1950), so wird offenbar, daß die höhere UV-Empfindlichkeit des Phagen T2 weitestgehend durch die stärkere PhR kompensiert werden kann. Eigene Experimente, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, zeigten zwar, daß unter optimalen PhR-Bedingungen die T4-Werte fast niemals von

den T2-Werten völlig erreicht wurden, doch war der Unterschied gering genug, um annehmen zu können, daß dies methodisch bedingt und die T2- mit der T4-Kurve unter wirklich optimalen PhR-Bedingungen identisch sei. Diese Vermutung lassen unter anderem auch die Experimente von Symonds und McCloy (1958) zu, die zeigten, daß bei der maximal reaktivierenden Lichtdosis bereits eine gewisse Licht-Inaktivierung überlagert ist.

Die aus diesem Sachverhalt folgende Vermutung, daß alle oder nahezu alle durch das *u*-Gen reaktivierbaren UV-Schäden auch photoreaktivierbar sind, ließ sich in den vorliegenden experimentellen Untersuchungen verifizieren: Analog der Versuchsanordnung in Abb. 2 wurden Monokomplexe von *E. coli B* mit UV-inaktivierten T2 zunächst einmal maximal photoreaktiviert und danach mit stark UV-inaktivierten T4-Partikeln multipel infiziert, während die Kontrollen ausschließlich photoreaktiviert wurden. Die Neigung beider Kurven war gleich, während bei einer ungestörten Überlagerung der beiden Reaktivierungsarten die Kontrollkurve etwa doppelt so steil hätte verlaufen müssen. Danach scheint der Schluß gerechtfertigt, *daß alle oder doch die überwiegende Mehrheit der durch das u-Gen reaktivierbaren UV-Schäden gleichzeitig photoreaktivierbare Schäden darstellen*, während das Umgekehrte nicht ganz zutreffen kann, da ja das Ausmaß der PhR etwas größer ist als das der *u*-Gen-Reaktivierung. Da die photoreaktivierbaren Letalschäden eine definierte Gruppe unter den gesamten Letalschäden darstellen (Dulbecco, 1950), muß man aus der Identität der durch das *u*-Gen reaktivierbaren Schäden mit dem größten Teil der photoreaktivierbaren Schäden schließen, daß auch die durch das *u*-Gen reaktivierbaren Schäden eine definierte Gruppe darstellen. Mit anderen Worten: Die Reaktivierung von 50% der Letalschäden durch die Wirkung des *u*-Allels bedeutet keineswegs, daß jeder Treffer in T4 mit der Wahrscheinlichkeit 0,5 reaktiviert werden kann, sondern daß unter der Gesamtheit der Treffer im Durchschnitt 50% derart sind, daß sie mit Sicherheit reaktiviert werden.

### F. Empfindlichkeitsunterschied zwischen *u*- und $u^+$-Phagen während der Latenzperiode

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich das Verhältnis der relativen UV-Empfindlichkeit zwischen *u*- und $u^+$-Phagen während der Latenzperiode verändert. Hierzu wurden die Phagen $\overline{T2}\,u\,h\,r_{22}$ und $\overline{T2}\,u^+h^+r_{22}{}^+$ verwendet, die sich außer in ihrer UV-Empfindlichkeit auch in dem *r*-Marker und in dem *h*-Marker unterschieden. Die letztere Tatsache gestattete es, das Überleben beider Phagentypen in der gleichen Probe und auf der gleichen Indikatorplatte festzustellen, indem auf einem Mischindikator von 2 Vol.-Einheiten *E. coli B* mit 5 Vol.-Einheiten *E. coli B/2* ausgeplattet wurde. Dabei erschienen die $\overline{T2}\,u\,h\,r_{22}$-Phagen als klare Plaques, die $\overline{T2}\,u^+h^+r_{22}{}^+$ als trübe Plaques. Beide Phagentypen wurden mit einer Multiplizität von etwa $10^{-3}$ in Phosphatpuffer an *E. coli B*-Zellen adsorbiert. Durch Zugabe von 10fach konzentrierter Bouillon zum Adsorptionsgemisch bei 37°C wurde die intrazelluläre Entwicklung in Gang gesetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, in eisgekühlten Puffer verdünnt und jeweils mit der gleichen Dosis (25 sec) UV-bestrahlt. Die Überlebenswerte, die aus mehreren unabhängigen Versuchen gewonnen wurden, sind in Abb. 5 wiedergegeben.

Die in der graphischen Darstellung zum Ausdruck kommende Empfindlichkeitsverringerung während der Latenzperiode ist allgemein als Luria-Latarjet-Effekt bekannt (LURIA und LATARJET 1947, BENZER 1952). Die Zeitskala ist in den hier wiedergegebenen Versuchen nicht mit der üblichen Zeitskala des intrazellulären Phagenwachstums zu vergleichen, da die Zellen nach Infektion *nicht belüftet* wurden. Bemerkenswert ist, daß bei beiden Phagentypen die Empfindlichkeit von Beginn der Latenzperiode an in *gleicher* Weise verringert wird, so daß auch noch in einem intrazellulären Stadium, in dem die UV-Empfindlichkeit nur noch etwa $^1/_6$ der ursprünglichen beträgt, der *u*-Phage nur halb so stark inaktiviert wird wie der $u^+$-Phage.

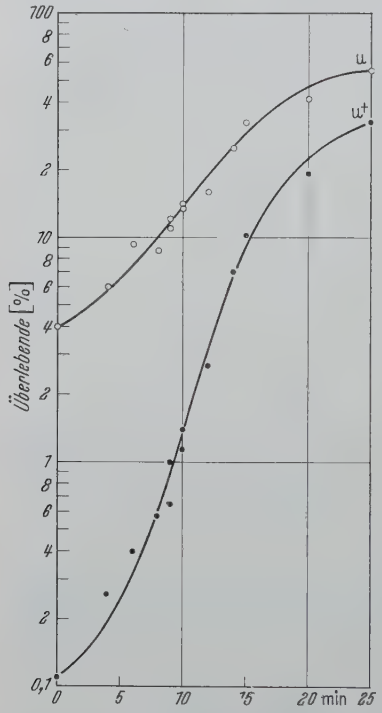



Abb. 5. Überlebensprozentsätze von *u*-Phagen (○) und $u^+$-Phagen (●) bei Bestrahlung mit konstanter UV-Dosis (25 sec) zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der intrazellulären Phase (vgl. Text)

Man könnte in diesen Ergebnissen eine Diskrepanz zu denen von SYMONDS und MCCLOY (1958) sehen, nach denen sich bei T2 die Empfindlichkeit von Beginn der Latenzperiode an verringert, bei T4 jedoch nicht, so daß der Empfindlichkeits*unterschied* zwischen T2 und T4 in der ersten Zeit der Latenzperiode sukzessive kleiner wird. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten jedoch davon herrühren, daß T2 und T4 sich in mehr Charakteristika unterscheiden als nur in dem *u*-Gen. Wenn der Luria-Latarjet-Effekt darauf beruht, daß zahlreiche Gene nach Ausübung ihrer intrazellulären Funktion ihre UV-Empfindlichkeit weitgehend verringern (BENZER 1952), dann müßte man aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, daß sich die Wirkung des *u*-Gens *nicht* vorzugsweise auf Gene mit früher Funktion in der Latenzperiode bezieht. Vielmehr darf man wohl annehmen, daß die durch das *u*-Allel reaktivierbaren Schäden über das Genom weit verstreut liegen; die in Abschnitt G mitgeteilten Experimente lassen den gleichen Schluß zu.

### G. Kreuzungsreaktivierung des $r_{22}^+$-Markers in *u*- und $u^+$-Phagen

In den im folgenden mitgeteilten Experimenten wurde die Kreuzungsreaktivierung („Cross-Reaktivation" oder „Marker Rescue"; siehe z. B. DOERMANN et al. 1955) des $r_{22}^+$-Markers in UV-inaktivierten *u*- und $u^+$-Phagen untersucht. Die „Kreuzungen", die in *E. coli B*-Zellen durchgeführt wurden, waren folgende:

a) $\overline{\text{T2}}u^+h^+r_{22}^+$ (UV-bestrahlt) × $\overline{\text{T2}}u^+hr_{22}$ (unbestrahlt).

b) $\overline{\text{T2}}uh^+r_{22}^+$ (UV-bestrahlt) × $\overline{\text{T2}}u^+hr_{22}$ (unbestrahlt). (Der *h*-Marker ist hier ohne Belang.)

Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt, wobei die Ordinate den Prozentsatz der mischinfizierten Zellen wiedergibt, bei denen in der Nachkommenschaft mindestens 1 lebensfähiger $r_{22}^+$-Phage erscheint. Die experimentelle Feststellung dieser Werte geschah durch Ausplatten der Komplexe auf Indikatorbakterien *E. coli C 600 (λ)* (APPLEYARD 1954), einem Unterstamm von *K 12 (λ)*, wo nur die $r^-$-Genotypen einen Plaque zu bilden vermögen. In der graphischen Darstellung ist die Abszissenachse oberhalb 16 Dosiseinheiten 4fach gestaucht. Es kommt deutlich zum Ausdruck, daß im niederen Dosisbereich die Kreuzungs-

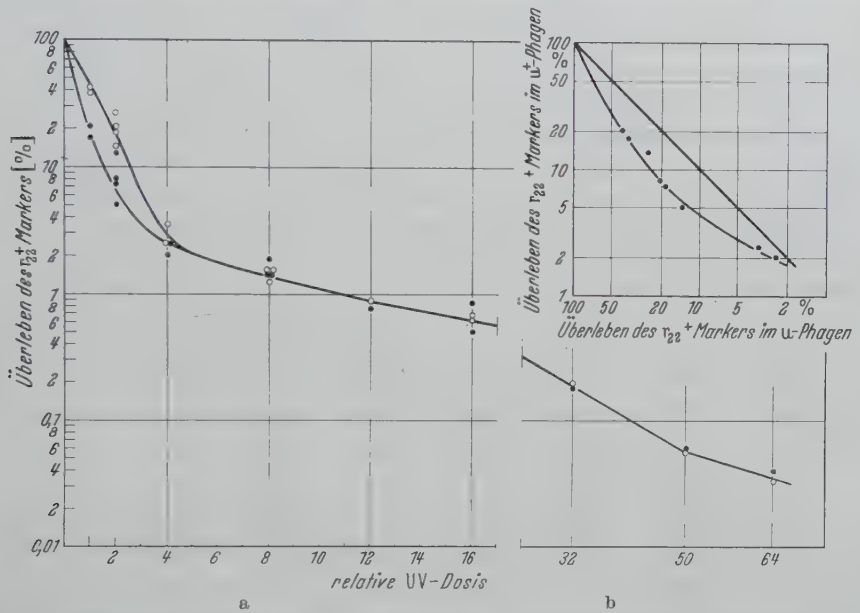



Abb. 6. a Kreuzungs-Reaktivierung des $r_{22}^+$-Markers in $u$-Phagen (○) und $u^+$-Phagen (●). Die Abszissenachse oberhalb 16 Dosiseinheiten ist 4fach gestaucht. Zur besseren Demonstration des Unterschiedes im niederen Dosisbereich ist in Teil b für jedes Experiment gesondert das Überleben des $r_{22}^+$-Markers im $u^+$-Phagen (Ordinate) gegen das Überleben des $r_{22}^+$-Markers im $u$-Phagen (Abszisse) aufgetragen. Die Gerade gibt an, wie die Punkte liegen müßten, wenn das Überleben des $r_{22}^+$-Markers in $u$- und $u^+$-Phagen gleich wäre

reaktivierungs-Kurve des $u^+$-Phagen mit der des $u$-Phagen divergiert, bei Steigerung der UV-Dosis aber wieder konvergiert, bis schließlich beide Kurven über einen weiten Bereich hin (von etwa 70 bis etwa 1000 Inaktivierungsdosen[1] des $u^+$-Phagen) identisch verlaufen.

Zur Veranschaulichung des Unterschiedes im niederen Dosisbereich ist in Teil b der Abbildung für jedes Experiment gesondert das Überleben des $r_{22}^+$-Markers im $u^+$-Phagen (Ordinate) gegen das Überleben der $r_{22}^+$-Markers im $u$-Phagen (Abszisse) aufgetragen. Die Gerade gibt an, wie die Punkte liegen müßten, wenn das Überleben des $r_{22}^+$-Markers in $u$- und $u^+$-Phagen gleich wäre.

Nach allgemeiner Ansicht ist die Kreuzungsreaktivierungs-Wahrscheinlichkeit identisch mit der Wahrscheinlichkeit, daß ein Genombereich, der den betreffenden Marker trägt und der nicht größer sein darf als der Abstand zwischen

[1] Als Inaktivierungsdosis $D_i$ wird bei exponentiellen Dosis-Effekt-Kurven diejenige Dosis bezeichnet, bei der der Bruchteil $e^{-1} = 36{,}8\,\%$ überlebt, d. h. bei der *durchschnittlich* auf jedes Individuum 1 Treffer kommt.

den nächstgelegenen UV-Letaltreffern rechts und links des Markers, durch genetische Rekombination einem aktiven Phagen einverleibt wird. Die Größe des markertragenden und zu rekombinierenden Stückes nimmt natürlich mit zunehder UV-Dosis ab und verringert somit die Kreuzungsreaktivierungs-Wahrscheinlichkeit.

Danach müßte man aus Abb. 6 schließen, daß im niederen Dosisbereich das nichtgeschädigte markertragende Stück durchschnittlich im $u$-Phagen gößer ist als im $u^+$-Phagen, während im höheren Dosisbereich die Größen gleich sind. Aus dem Grad der Kurvendivergenz bei sehr geringen Dosen (Neigungsverhältnis $\approx 1:2$) würde man folgern, daß eine gleiche Größe des nichtgeschädigten markertragenden Stückes beim $u$-Phagen eine etwa doppelte UV-Dosis erfordert wie beim $u^+$-Phagen. Dies stünde im Einklang mit der bereits in Abschnitt F geäußerten Vermutung, daß die durch das $u$-Gen reaktivierbaren UV-Schäden über das Genom hin weit verteilt sind. Die Konvergenz und schließlich die Identität der Kurven im höheren Dosisbereich könnte hingegen bedeuten, daß UV-Treffer in der unmittelbaren Umgebung des $r_{22}{}^+$-Markers nicht durch das $u$-Gen reaktivierbar sind.

Eine weitere Stütze für die allgemeine Deutung der $u$-Gen-Wirkung als Reaktivierungserscheinung ergibt sich aus dem hier nicht graphisch wiedergegebenen Befund, daß die Kurven für $u$- und $u^+$-Phagen selbst im niederen Dosisbereich identisch verliefen, wenn der *unbestrahlte* Phage vom Typ $u$ war, d. h., wenn in *jedem* mischinfizierten Komplex ein funktionsfähiges $u$-Gen vorhanden war.

### H. Funktionelles Überleben eines *rII*-Cistrons in $u^-$ und $u^+$-Phagen

Im letzten Abschnitt wurde gefolgert, daß die durch das $u$-Gen reaktivierbaren Treffer offenbar weite Bereiche der DNS betreffen, möglicherweise jedoch nicht die unmittelbare Nähe des $r_{22}{}^+$-Markers. Im folgenden kann tatsächlich experimentell gezeigt werden, daß zumindest das eine der beiden *rII*-Cistren (BENZER 1955, 1957) von der Reaktivierung durch das $u$-Gen nicht betroffen wird.

*Versuchsdurchführung.* Nach einer von KRIEG (1959) angegebenen Methode zur Prüfung der Funktion der *rII*-Cistren wurden die Versuche wie folgt angelegt: Zellen von *E. coli K 112—12 (λh)*, einem Unterstamm von *K 12 (λ)*, wurden mit UV-bestrahlten $\overline{\mathrm{T2}}u^+h^+r_{22}{}^+$ (bzw. in dem zu vergleichenden Teil des Versuchs mit $\overline{\mathrm{T2}}uh^+r_{22}{}^+$) einzelinfiziert und gleichzeitig mit unbestrahlten Phagen des Typs $\overline{\mathrm{T2}}u^+hr_{22}$ in einer durchschnittlichen Multiplizität um 1. Die Komplexe wurden dann mit *E. coli B* ausgeplattet und aus den Plaques das Überleben der Funktionsfähigkeit des betreffenden *rII*-Cistrons für die jeweilige Dosis berechnet. Dazu durfte als Bezugswert bei der Dosis Null nur derjenige Teil der Plaques berücksichtigt werden, der von mischinfizierten Komplexen stammte und der sich aus der Multiplizität der $r_{22}$-Phagen leicht errechnen ließ. Kontrollen, in denen statt des UV-bestrahlten $\overline{\mathrm{T2}}u^+h^+r_{22}{}^+$ Puffer dazu gegeben wurde, zeigten beim Ausplatten nur sehr geringe Plaquezahlen, mit Hilfe derer die experimentellen Werte jeweils korrigiert werden konnten.

Die Ergebnisse solcher Versuche sind in Tabelle 1 wiedergegeben und die Mittelwerte in Abb. 7 graphisch dargestellt. Obwohl bei der angewandten Methodik die Überlebensprozentsätze von Experiment zu Experiment stärker als üblich

schwankten, zeigt doch der Vergleich innerhalb der Einzelversuche wie auch die Mittelbildung deutlich, daß zwischen $u$- und $u^+$-Phagen kein merklicher Unterschied im UV-Überleben der Funktionsfähigkeit des den $r_{22}$-Marker tragenden $rII$-Cistrons vorhanden ist. Dies steht in Übereinstimmung mit der aus den Kreuzungsreaktivierungs-Experimenten gezogenen Schlußfolgerung, daß die UV-Empfindlichkeit der unmittelbaren Umgebung des $r_{22}^+$-Markers unabhängig davon ist, ob der Phage das $u$- oder das $u^+$-Allel besitzt. Wie in der Diskussion noch eingehender ausgeführt wird, steht diese Tatsache in gutem Einklang mit den Vorstellungen von KRIEG (1959) bezüglich der „kritischen Funktion" der beiden $rII$-Cistren und von EPSTEIN (1958) bezüglich der Deutung der $rII$-Cistren als „vulnerable centers" im Sinne BARRICELLIS (1956).

Es könnte hier der Einwand erhoben werden, daß die Identität

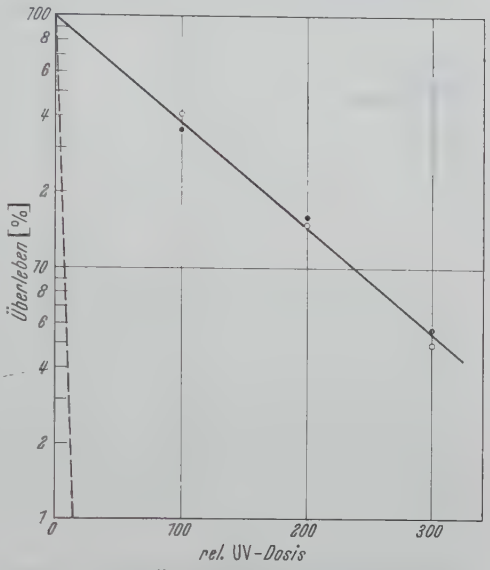



Abb. 7. Dosis-Überlebenskurve des untersuchten $rII$-Cistrons in $u$-Phagen (○) und $u^+$-Phagen (●) (s. auch Tabelle 1). Die gestrichelte Linie gibt für den gleichen Dosismaßstab die Neigung der Überlebenskurve des $u^+$-Phagen selbst an

Tabelle 1. *Überlebensprozentsätze der physiologischen Funktion des rII-Cistrons, das den $r_{22}^+$-Marker trägt, in u- und $u^+$-Phagen*

| Versuchs-Nr. | $u^+$-Phage | | | $u$-Phage | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | rel. UV-Dosis | | | rel. UV-Dosis | | |
| | 100 | 200 | 300 | 100 | 200 | 300 |
| 211 | 43,5% | 21,6% | — | — | 20,0% | — |
| 212 | 34,6% | 18,4% | 8,4% | 55,0% | 19,3% | 9,4% |
| 214 | 24,8% | 10,7% | 4,9% | 18,0% | 5,7% | 2,8% |
| 215 | 20,0% | 11,7% | 5,2% | 32,0% | 13,5% | 6,0% |
| 218 | 34,1% | 14,4% | 5,7% | 53,3% | 21,8% | 4,4% |
| 221 | 28,6% | 11,0% | 3,7% | 36,6% | 13,0% | 3,0% |
| 223 | 35,5% | 8,7% | 4,4% | 51,7% | 10,7% | 3,7% |
| 228 | 51,6% | 20,5% | 6,2% | | | |
| 230 | 38,7% | 16,9% | 8,4% | | | |
| 232 | 35,8% | 14,2% | 6,1% | | | |
| 245 | 42,1% | 29,3% | 4,2% | | | |
| Mittelwert | 35,4% | 16,1% | 5,7% | 41,1% | 14,9% | 4,9% |

der Kurven in $u$- und $u^+$-Phagen ihre Ursache in den relativ hohen UV-Dosen habe, bei denen die Wahrscheinlichkeit nicht mehr klein ist, daß das $u$-Gen selbst inaktiviert wird. Es läßt sich jedoch leicht errechnen, daß bei einer relativen Empfindlichkeit des $u$-Gens von maximal 0,9% die Kurvenpunkte für den $u$-Phagen doch merklich höher liegen müßten als für den $u^+$-Phagen, wenn die Reaktivierung innerhalb des $rII$-Cistrons in gleichem Maße stattfände wie im übrigen Genom. Bei extrem hohen UV-Dosen, wie sie bei den

Kreuzungsreaktivierungs-Experimenten angewandt wurden, kann der obige Einwand allerdings nicht experimentell widerlegt werden. Gegen die Berechtigung eines solchen Einwandes spricht außerdem sehr die geringe Kurvenneigung in Abb. 7, die nur etwa 2,5% der Neigung der vergleichweise eingetragenen T 2-Überlebenskurve beträgt. In entsprechenden Versuchen mit T 4 hatte KRIEG (1959) für das *rII-B*-Cistron, in dem der $r_{22}$-Marker liegt, 5% der T 4-Gesamtempfindlichkeit gefunden. Wäre die Identität der Kurvenpunkte in Abb. 7 auf Inaktivierung des *u*-Gens zurückzuführen, so müßte die Neigung der Kurve nicht 2,5%, sondern 5% der Neigung der T2-Überlebenskurve betragen.

## Diskussion

Fassen wir zunächst die wesentlichsten Ergebnisse zusammen:

1. Das *u*-Gen bewirkt — je nachdem ob es in der Form des $u^+$-Allels oder des *u*-Allels vorliegt — den Empfindlichkeitsunterschied zwischen T2 und T4 auf dem Wege über einen zellphysiologischen Reaktivierungsmechanismus. Die primären UV-Wirkungen sind in T2 und T4 offenbar gleich.

2. Die UV-Empfindlichkeit des *u*-Gens selbst als physiologisch-funktionelle Einheit (Cistron) beträgt $(0{,}9 \pm 0{,}2)$% der T2-Gesamtempfindlichkeit.

3. Die UV-ausgelösten Letalschäden, die durch die Wirkung des *u*-Allels reaktiviert werden, sind völlig oder zum überwiegenden Teil identisch mit photoreaktivierbaren Schäden.

4. Die reaktivierende Wirkung des *u*-Allels bleibt in gleichem Ausmaß während der intrazellulären Periode der Empfindlichkeitsverringerung (Luria-Latarjet-Effekt) bestehen, zumindest bis zu einem Stadium, in dem die Empfindlichkeit nur noch etwa $^1/_6$ der ursprünglichen beträgt.

5. Diese Tatsache sowie die Ergebnisse von Kreuzungsreaktivierungs-Experimenten sprechen sehr dafür, daß die durch das *u*-Allel reaktivierbaren Letalschäden weite Bereiche des Genoms betreffen können.

6. Nicht betroffen von derartigen Schäden bzw. von der Möglichkeit, sie zu reaktivieren, ist die *rII*-Region (oder zumindest das *rII-B*-Cistron, das hier geprüft wurde). Dies folgt insbesondere aus Experimenten, in denen das Überleben der Funktionsfähigkeit des Cistrons selbst untersucht wurde.

Es soll nun versucht werden, auf Grund dieser Befunde zu einem Bild über die quantitative Aufgliederung der verschiedenen UV-Schäden im Genom von T2 und T4 zu gelangen. Einige Zahlenwerte, die sich aus den bisher vorliegenden experimentellen Ergebnissen abschätzen lassen, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Der gleichen Gesamtmenge des UV-empfindlichen Materials (DNS) entspricht eine gleiche primäre Gesamtempfindlichkeit beider Phagentypen. Sie wird in der Tabelle ausgedrückt durch 100 Empfindlichkeits-Einheiten (E.E.), d. h. 1 E.E. entspricht 1% der primären Gesamtempfindlichkeit. Das *u*-Gen selbst macht demzufolge nur etwa 0,9 E.E. aus. Bei T4 werden etwa 50 E.E. obligatorisch durch die Anwesenheit des *u*-Allels reaktiviert, so daß als experimentell feststellbare Gesamtempfindlichkeit von T4 nur etwa 50 E.E. übrig bleiben. *Das bedeutet, daß T2 doppelt so empfindlich ist wie T4.*

Durch Photoreaktivierung werden bei T2 die Schäden von etwa 60 E.E. rückgängig gemacht. Bei T4 wären es ebenfalls 60; da diese aber die Schäden von 50 E.E. einschließen, die ohnehin durch die Anwesenheit des *u*-Allels reaktiviert werden, ist bei T4 tatsächlich nur die Photoreaktivierung von 10 E.E. zu

Tabelle 2. *Quantitative Aufgliederung der verschiedenen UV-Schäden im Genom von T2 und T4* (vgl. Text)

| | T2 | | T4 | |
|---|---|---|---|---|
| | Ausgedrückt in Empfindlichkeits-Einheiten | Ausgedrückt in Prozent der Gesamtempfindlichkeit | Ausgedrückt in Empfindlichkeits-Einheiten | Ausgedrückt in Prozent der Gesamtempfindlichkeit |
| Gesamtempfindlichkeit . | 100 | | 100 (−50, die durch das *u*-Allel reaktiviert werden) = 50 | |
| Photoreaktivierbarer Anteil | 60 | 60% | 60 (−50, die durch das *u*-Allel ohnehin reaktiviert werden) = 10 | 20% |
| Empfindlichkeit der 3 „vulnerable centers" . | 20 | 20% | 20 | 40,0% |
| davon *r*II-A . . . . | 5 | 5% | 5 | 10,0%[1] |
| davon *r*II-B . . . . | 2,5 | 2,5% | 2,5 | 5,0%[1] |
| Empfindlichkeit des *u*-Gens . . . . . | 0,9 | 0,9% | 0,9 | 1,8% |

[1] Nach KRIEG (1959).

beobachten. *Der photoreaktivierbare Anteil der Letalschäden beträgt* somit bei T2 etwa 60/100 = 60%, bei T4 dagegen nur etwa 10/50 = 20%. Die Überlagerung der durch das *u*-Allel reaktivierbaren Schäden mit dem größten Teil der photoreaktivierbaren Schäden macht folgende beiden Tatsachen verständlich: a) daß unter Bedingungen maximaler Photoreaktivierung die Überlebenskurven von T2 und T4 nahezu gleich sind und b) daß das *u*-Gen, das den Grad der UV-Empfindlichkeit bestimmt, auch automatisch den Grad der Photoreaktivierbarkeit determinieren muß. Für die sog. „*vulnerable centers*", die von BARRICELLI (1956) für die Erklärung der Multiplizitäts-Reaktivierungs-Experimente postuliert wurden, sind in der Tabelle 2 sowohl für T2 wie für T4 je 20 E.E. eingetragen. Dieser Wert ergibt sich aus folgenden Überlegungen:

Auf Grund der Ergebnisse von Multiplizitäts-Reaktivierungs-Experimenten verschiedener Autoren (DULBECCO 1952, HARM 1956, EPSTEIN 1958) errechnete BARRICELLI (1958), daß bei T2 3 „vulnerable centers" mit etwa 20% der Gesamtempfindlichkeit vorhanden sind, bei T4 ebenfalls 3, jedoch mit etwa 40% der Gesamtempfindlichkeit. Da die Annahme naheliegt, daß es sich in beiden Phagen um die gleichen „vulnerable centers" handelt, und da T2 doppelt so UV-empfindlich ist wie T4, erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß die *Absolut*-Empfindlichkeit der vulnerable centers in beiden Phagen gleich ist und demzufolge etwa 20 E.E. betragen müßte. *Dies bedeutet, daß die in den vulnerable centers eintretenden Letalschäden nicht durch die Wirkung des u-Gens reaktivierbar sind.*

Legt man die Ergebnisse EPSTEINS (1958) zugrunde, nach denen die beiden *rII*-Cistren vulnerable centers sind, so stehen diese Überlegungen in gutem Einklang mit den in den Abschnitten G und H mitgeteilten Ergebnissen, wonach zumindest das hier untersuchte *rII*-Cistron (*rII-B*) gleiche UV-Empfindlichkeit in *u*- und $u^+$-Phagen hat. Möglicherweise beruht die in diesem Bereich bestehende Nichtreaktivierbarkeit der Letalschäden durch das *u*-Gen

auf der „kritischen Funktion" der beiden *rII*-Cistren (KRIEG 1959), die eine notwendige Voraussetzung für die DNS-Reduplikation darstellt. Aus dieser kritischen Funktion ergibt sich nach KRIEG auch die relativ hohe UV-Empfindlichkeit der *rII*-Region, die ein Mehrfaches dessen beträgt, was man nach ihrer aus Kreuzungsexperimenten abgeschätzten Größe erwarten würde: Nimmt man nämlich an, daß ein merklicher Prozentsatz der UV-Schäden die *Funktion* eines Gens verhindern kann, jedoch nicht die *Reduplikation* (und damit die Produktion ungeschädigter Kopien dieses Gens), so müssen Gene mit einer solchen „kritischen Funktion" UV-empfindlicher sein als andere. Hierzu passen die Ergebnisse EPSTEINS (1958), wonach die beiden *rII*-Cistren „vulnerable centers" sind. Die Natur der „vulnerable centers" würde darin liegen, daß sie völlig intakt sein müssen, um durch ihre Funktion erst die Voraussetzung für die zur Multiplizitäts-Reaktivierung notwendige Rekombination zu schaffen.

Faßt man die hier mitgeteilten Ergebnisse und die theoretischen Vorstellungen KRIEGS und EPSTEINS zusammen, so könnte man schließen, daß auch für die Reaktivierung von Letalschäden durch das *u*-Gen die Funktion der *rII*-Cistren eine notwendige Voraussetzung ist und daß demzufolge dieser Reaktivierungsvorgang nicht auf einem sehr frühen Stadium erfolgen kann.

Inwieweit eine Überschneidung der photoreaktivierbaren Schäden mit Schäden in „vulnerable centers" besteht, ist noch recht unklar. Auf Grund der Experimente DULBECCOS (1952) hatte BARRICELLI (1956) geschlossen, daß 2 der 3 „vulnerable centers" durch Photoreaktivierung verschwinden. Hierfür kämen wegen der erschlossenen Nichtüberschneidung von Schäden in „vulnerable centers" mit den durch das *u*-Allel reaktivierbaren Schäden nur noch etwa 10 E.E. in Frage. Allerdings dürfte dieser Wert wegen der Differenzbildung relativ ungenau sein.

Aus den in den Abschnitten F und G mitgeteilten Ergebnissen wurde geschlossen, daß sich die durch das *u*-Allel reaktivierbaren Schäden über einen relativ großen Teil des Genoms (vielleicht über das Gesamtgenom mit Ausnahme der „vulnerable centers") erstrecken. Diese Schlußfolgerung ist auch aus anderen Gründen naheliegend: Da es sich um etwa die Hälfte aller Schäden handelt, muß man vermuten, daß sie auch in mindestens dem halben Bereich des Gesamtgenoms eintreten können; andernfalls wäre man zu der Annahme gezwungen, daß diese Schäden vorzugsweise in Genomregionen mit überdurchschnittlich hoher Relativempfindlichkeit liegen, eine Möglichkeit, auf die bereits STREISINGER (1956) hinwies. Wäre das letztere der Fall, so müßte sich eine solche Genomregion bei der Multiplizitäts-Reaktivierung als „vulnerable center" bemerkbar machen. Gegen eine derartige Deutung spricht jedoch sehr, daß die Zahl der „vulnerable centers" bei T2 und T4 gleich ist und daß der darin lokalisierte Bruchteil der Gesamtempfindlichkeit gerade bei T4 höher ist als bei T2, während man nach dieser Deutung das Gegenteil erwarten müßte.

Es gilt bei den Phagen als Regel, daß ihre Empfindlichkeit gegenüber der inaktivierenden Wirkung von ionisierenden Strahlen und P32-Zerfall ihrem relativen DNS-Gehalt in etwa proportional ist. Dies trifft auch für T2 und T4 zu. Für die UV-Empfindlichkeit der Phagen gilt jedoch die Proportionalitätsregel keineswegs. Als Ursache dafür kommen bei temperenten Phagen Reaktivierungsvorgänge durch Austausch mit ungeschädigten homologen Bereichen des Wirtsbakteriengenoms in Frage (GAREN und ZINDER 1955), eine Deutung,

die z. B. auch für die flacher geneigte Komponente der T1-Überlebenskurve (Tessman und Ozaki 1957) zuzutreffen scheint. Die hier wiedergegebenen Experimente zeigen, daß die unterschiedliche UV-Empfindlichkeit zwischen T2 und T4 ebenfalls auf einem obligatorischen Reaktivierungsvorgang beruht, der jedoch offensichtlich nicht mit einem Austausch von genetischem Material verknüpft ist. Demzufolge müßte die Empfindlichkeit von T2, im Gegensatz zu der von T4, die für die vorhandene DNS-Menge „richtige" UV-Empfindlichkeit sein. Hierfür spricht weiterhin, daß der nahe verwandte Phage T6, der auch etwa die gleiche DNS-Menge besitzt wie T2 und T4, sich in seiner Empfindlichkeit wie T2 verhält, so daß T4 die Ausnahme darstellt. Nach Garen und Zinder (1955) entspricht auch das Verhältnis der Röntgenempfindlichkeit von P22 zu der von T2 dem Verhältnis ihrer UV-Empfindlichkeit, sofern man bei P22 durch Bestrahlung der Wirtsbakterien den Reaktivierungsmechanismus ausschaltet. Diese Tatsachen scheinen darauf hinzudeuten, daß es auch bei der UV-Inaktivierung der Phagen eine der DNS-Menge entsprechende „Normalempfindlichkeit" gibt und daß die für ionisierende Strahlen und P32-Zerfall geltende Faustregel auch für UV Gültigkeit besitzt, sofern man die überlagerten Reaktivierungserscheinungen in Abzug bringt.

Nach allem wäre es denkbar, daß es für T2 und T4 ein Wirtsbakterium gibt, das genetisch nicht imstande ist, die vom *u*-Allel initiierte Reaktivierung durchzuführen, so daß in diesem Falle die UV-Empfindlichkeit und Photoreaktivierbarkeit bei T2 und T4 identisch sein müßte. Wenn die hier gezogenen Schlußfolgerungen richtig sind, so müßte in diesem Falle auch die Multiplizitäts-Reaktivierung von T2 und T4 gleiches Ausmaß haben.

Experimente, in denen versucht werden sollte, durch sehr starke UV- oder Röntgenbestrahlung der Bakterien vor der Infektion das zelluläre Reaktivierungssystem zu stören und auf diese Weise eine Angleichung der UV-Überlebenskurven von T2 und T4 zu erreichen, schlugen fehl. Selbst bei Dosen, bei denen ein großer Prozentsatz der Zellen die Kapazität zur Phagenvermehrung verloren hatte, war keine Beeinflussung der T4-Überlebenskurve zu beobachten. Offenbar ist bei dem zellulären Reaktivierungssystem der Wirkungsquerschnitt zu klein gegenüber dem der Kapazität. Das Ergebnis zeigt lediglich, daß bei der *u*-Gen-Reaktivierung ein Austausch geschädigten genetischen Materials zwischen Bakterium und Phagen, wie er z. B. bei P22, T3 und T1 stattfindet, keine Rolle spielt.

## Summary

1. The phage gene *u*, determining the difference in UV-sensitivity between T2 and T4, is shown to act by some cellular reactivation mechanism. I.e., the primary UV-lesions are identical in both phage types, but the presence of the *u*-allele in T4 (as opposed to the $u^+$-allele in T2) results in reactivation of about 50% of the otherwise lethal damages. For the T4-like survival it is sufficient to have an intact *u*-allele within the phage-bacterium complex, but not necessarily within the proper phage to be reactivated.

2. The sensitivity of the *u*-gene, relative to the total UV-sensitivity of T2, is determined to be about $(0{,}9 \pm 0{,}2)\%$.

3. Lethal UV-damages reactivable by the *u*-allele action are almost identical with photoreactivable damages. They do not concern preferentially genetic

material with early intracellular function. At an intracellular stage, where the *u*-phage sensitivity is reduced to about $^1/_6$ the original one (Luria-Latarjet-effect), the *u*-phage sensitivity is also reduced to $^1/_6$.

4. Marker rescue experiments with *u*- and $u^+$-phage led to the conclusion that the UV-damages reactivable by the *u*-allele action are destributed widely over a large part of the genome, with the exception of the *rII*-region (or at least one of the two *rII*-cistrons). The latter was confirmed by experiments on survival of phenotype of this *rII*-cistron.

5. The results are discussed with respect to the extent of different kinds of UV-damages and the relations between them.

Mein besonderer Dank gilt Frau Barbara M. Schreiber und Fräulein Elisabeth Cornehls für umsichtige und gewissenhafte technische Assistenz sowie der „Deutschen Forschungsgemeinschaft" für die Unterstützung eines Teils der Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

## Literatur

Adams, M. H.: Bacteriophages. Appendix: Methods of study of bacterial viruses. New York: Interscience Publ. 1959. — Appleyard, R. K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K12. Genetics **39**, 440—452 (1954). — Barricelli, N. A.: A "chromosomic" recombination theory for multiplicity reactivation in phages. Acta biotheor. (Leiden) **11**, 107—120 (1956). — The partial-replica theory for phage recombination and reproduction. I. Multiplicity-reactivation and the nature of vulnerable centers. Manuskript. 1958. — Benzer, S.: Resistance to ultraviolet light as an index to the reproduction of bacteriophage. J. Bact. **63**, 59—72 (1952). — Fine structure of a genetic region in bacteriophage. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **41**, 344—354 (1955). — The elementary units of heredity. In: A symposium on the chemical basis of heredity, p. 70—93. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957. — Doermann, A. H., M. Chase and F. W. Stahl: Genetic recombination in bacteriophage. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl. 2, 51—74 (1955). — Dulbecco, R.: Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. J. Bact. **59**, 329—347 (1950). — A critical test of the recombination theory of multiplicity reactivation. J. Bact. **63**, 199—207 (1952). — Epstein, R. H.: A study of multiplicity reactivation in the bacteriophage T4. I. Genetic and functional analysis of T4D-K12($\lambda$)-complexes. Virology **6**, 382—404 (1958). — Garen, A., and N. D. Zinder: Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. Virology **1**, 347—376 (1955). — Harm, W.: On the mechanism of multiplicity reactivation in bacteriophage. Virology **2**, 559—564 (1956). — Zur Deutung der unterschiedlichen UV-Empfindlichkeit der Phagen T2 und T4. Naturwiss. **45**, 391—392 (1958). — Krieg, D.: A study of gene action in ultraviolet-irradiated bacteriophage T4. Virology **8**, 80—98 (1959). — Luria, S. E.: Type hybrid bacteriophages. Rec. Genet. Soc. Amer. **18**, 102 (1949). — Luria, S. E., and R. Dulbecco: Genetic recombinations leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles. Genetics **34**, 93—125 (1949). — Luria, S. E., and R. Latarjet: Ultraviolet irradiation of bacteriophage during intracellular growth. J. Bact. **53**, 149—163 (1947). — Sinsheimer, R. L.: The glucose content of the desoxyribonucleic acids of certain bacteriophages. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 502—504 (1956). — Streisinger, G.: The genetic control of ultraviolet sensitivity levels in bacteriophages T2 and T4. Virology **2**, 1—12 (1956). — Streisinger, G., and J. Weigle: Properties of bacteriophages T2 and T4 with unusual inheritance. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 504—510 (1956). — Symonds, N., and E. W. McCloy: The irradiation of phage-infected bacteria: its bearing on the relationship between functional and genetic radiation damage. Virology **6**, 649 -668 (1958). — Tessman, E. S., and T. Ozaki: Multiplicity reactivation of bacteriophage T1. Virology **4**, 315—327 (1957).

Prof. Dr. Walter Harm,
Institut für Genetik, Abteilung Strahlenbiologie,
der Universität Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 445—456 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

# DIE INCOMPATIBILITÄTSBEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEOGRAPHISCHEN RASSEN VON *PODOSPORA ANSERINA* (CES.) REHM

## III. UNTERSUCHUNGEN ZUR GENPHYSIOLOGIE DER BARRAGEBILDUNG UND SEMI-INCOMPATIBILITÄT*

Von

KARL ESSER

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 26. Juni 1959)*

### I. Einleitung

*Podospora anserina* ist ein monözischer, tetrasporer Ascomycet. Seine Entwicklungsgeschichte und Genetik wurde bereits ausführlich in den beiden vorausgehenden Teilen dieser Arbeit geschildert (ESSER 1956a, 1959a)[1].

Wenn man auf einem Agar-Nährboden zwei Myzelien von verschiedenen Rassen der *P. anserina* aufeinander zuwachsen läßt, bleibt stets in der Kontaktzone in den Hyphenspitzen der beiden Partner die Bildung der grün-schwarzen Melaninfarbstoffe aus. Es entsteht eine 1—2 mm breite pigmentfreie Zone, die *Barrage* genannt wurde (RIZET 1952).

In den meisten Rassenkreuzungen zwischen selbst-incompatiblen +- und —-Kreuzungstypen (I, S. 596ff.) ist die Barragebildung mit Störungen der reziproken Compatibilität der zwittrigen Myzelien verknüpft (II, S. 41ff.), die sich als *reziproke* oder *nicht-reziproke Incompatibilität* (= *Semi-Incompatibilität* = SI) manifestieren.

In Teil I wurden die Ergebnisse der Gen-Analyse der zwischen den Rassen *s* und *M* auftretenden Barragebildung und SI mitgeteilt. Es zeigte sich, daß eine Barrage schon bei einer monogenen Differenz der Kreuzungspartner, die sich z. B. nur durch die Gene *t* und $t_1$ unterscheiden, ausgebildet wird. Allerdings ist in diesen Fällen eine Abweichung von der reziproken Compatibilität nicht gegeben (I, S. 604). Die Existenz von SI setzt dagegen eine digene Differenz der Partner voraus (z.B. $ab \times a_1b_1$). Die reziproke Incompatibilität, die auf einer additiven Wirkung zweier SI-Mechanismen beruht, basiert demnach auf einer tetragenen Verschiedenheit von zwei Kreuzungstypen (z.B. $abc_1v_1 \times a_1b_1cv$).

Die Incompatibilitätsphänomene in den Rassenkreuzungen von *P. anserina* stehen also bezüglich ihrer genetischen Bedingungen im Gegensatz zu den bisher bekannten Erscheinungen der sexuellen Unverträglichkeit der höheren Pflanzen und Pilze; denn die genetische Grundlage dieser Systeme ist die Incompatibilität genetisch gleicher Gameten bzw. Sexualorgane (z.B. $+ \times +$, $- \times -$). Um diesen prinzipiellen Unterschied, der auch für die Evolution der Species *anserina* von Bedeutung ist (II, S. 49ff.), herauszuheben, haben wir die zwischen den einzelnen Rassen von *P. anserina* existierenden Incompatibilitäts-Erscheinungen

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[1] Falls es im Verlauf dieser Arbeit zum Verständnis von begrifflichen Zusammenhängen oder Experimenten notwendig ist, wird unter Seitenangabe auf Teil I bzw. Teil II verwiesen.

unter dem Begriff „*heterogenische Incompatibilität*" zusammengefaßt. Für die übrigen Incompatibilitäts-Systeme wurde der Terminus „*homogenische Incompatibilität*" eingeführt (ESSER 1959b).

Weitere genetische Analysen (Teil II) ließen die Wirkungsweise der für die heterogenische Incompatibilität verantwortlichen Gene erkennen. Es konnte gezeigt werden, daß die SI auf der Unverträglichkeit von je einem Allel der beiden SI-Loci beruht (z. B. $a_1$ und $b$). Sie manifestiert sich nicht nur als Asymmetrie der Befruchtungsvorgänge, sondern auch als eine Hemmung der Kernvermehrung, wenn die incompatiblen Gene in einem Kern ($a_1 b$) vereinigt sind oder sich in verschiedenen Kernen eines Heterokaryons ($ab + a_1 b_1$) befinden.

Die ausschließlich für die Barragebildung verantwortlichen Gene lösen keine Störungen der Kernvermehrung aus. Sie bewirken, soweit bisher bekannt ist, lediglich eine Hemmung der Pigmentbildung in der Kontaktzone. *Barragebildung und SI sind also zwei verschiedene Phänomene.*

Durch weitere Untersuchungen war beabsichtigt, Anhaltspunkte über die physiologischen Vorgänge zu gewinnen, die durch die Barrage- und SI-Gene gesteuert werden.

## II. Material und Methoden

Zu den vorliegenden Untersuchungen wurden +- und —-Stämme der *Genotypen t u a b c v* (kurz *s* genannt), $t_1\, u_1\, a_1\, b_1\, c_1\, v_1$ (kurz *M* genannt), $t\, u\, a_1\, b_1\, c\, v$ $(= a_1 b_1)$, $t\, u_1\, a\, b\, c\, v$ $(= u_1)$, $t\, u_1\, a_1\, b_1\, c_1\, v_1$ $(= t)$ benutzt. $t/t_1$ und $u/u_1$ sind Barrage-Gene . $a/a_1$, $b/b_1$, $c/c_1$, $v/v_1$ sind SI-Gene.

Folgende *Nährböden* wurden verwendet: Pferdemist-Dekokt-Agar zur Sporenkeimung, Maismehl-Dekokt-Agar bzw. ein flüssiges Nährmedium zur vegetativen Myzelvermehrung. Als Nährlösung diente das synthetische Medium nach WESTERGAARD und MITCHEL (1947), das geringfügig modifiziert wurde und dessen Einfluß auf die Pigmentbildung nach Zusatz verschiedener C-Quellen bekannt ist (ESSER 1956b).

Um genügende Mengen von *Myzelmaterial für die physiologischen Untersuchungen* zu erhalten, wurde die sogenannte *Mischkultur-Methode* ausgearbeitet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß heterogene Stämme nach getrennter Anzucht vermischt und als Mischkulturen weitergezogen werden. Als Kontrollen läßt man die beiden Komponenten einer Mischkultur unter den gleichen Bedingungen als Einzelkulturen weiterwachsen. Die Anzucht, Vermischung, Weiterzucht und Aufarbeitung der Myzelien geschah auf folgende Weise:

Fernbachkolben (Vol. 1,8 Liter), die 200 ml Nährlösung enthielten, wurden mit je 80—100 kleinen Myzelstückchen (Agarwürfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm) beimpft und bei 26° C bebrütet. Als C-Quelle wurden dem Nährmedium 0,2% Fructose zugesetzt. Bei dieser Hexose-Konzentration pigmentieren sich die Myzelien nicht. Nach 7 Tagen war der Boden der Kulturgefäße von einem dichten Myzelrasen bedeckt. Wir trennten die Myzelien durch Filtration vom Nährmedium (Büchnertrichter) und befreiten sie durch Pressen zwischen Filterpapier von der überschüssigen Nährlösung. Zur Herstellung von Mischkulturen gaben wir die Myzelausbeute von 8 Kolben (je 4 enthielten den gleichen Genotyp) in einen „waring blendor" und fügten 160 ml frische Nährlösung zu, die an Stelle von Fructose 0,5% Glucose enthielt. Die Glucose fördert in dieser Konzentration die Pigmentbildung. Nach Zerkleinerung wurde der Brei, der aus mehrzelligen Myzelfragmenten besteht, zur Weiterzucht in Portionen von je 10 ml auf 100 ml Erlenmeyerkolben verteilt und bei 26° gehalten. Der Ansatz der als Kontrollen dienenden Einzelkulturen erfolgte auf die gleiche Weise mit homogenem Pilzmaterial. Sämtliche Manipulationen bei der An- und Weiterzucht wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach 3 Tagen begann die Aufarbeitung der gallertartigen Myzelstücke, die sich in den Erlenmeyerkolben gebildet hatten. Der Inhalt von je 4 Kolben wurde mit 250 ml Wasser gewaschen und zwischen Filterpapier kurz getrocknet. Die noch feuchten Myzelien wurden nach Einfrieren ($CO_2$-Acetongemisch) lyophilisiert und in einer Kugelmühle pulverisiert. Das Myzelpulver, das zum größten Teil aus Zellfragmenten bestand und nur wenige mehr-

zellige Hyphenstücke enthielt, haben wir bis zur weiteren Verarbeitung bei —15° C aufbewahrt. Die Ausbeute an lyophilisiertem Material aus einer Serie von 8 Fernbachkolben betrug etwa 500 mg.

Zur *Gewinnung von Eiweißlösungen* erwies sich nach mehrfacher Abänderung die folgende Methode als geeignet: Wir versetzten 1 g Myzelpulver mit 16 ml serologischem 0,1 m Phosphatpuffer ($p_H$ 7), fügten 6 g Glasperlen zu und eluierten die Mischung 24 Std in einer Schüttelmaschine bei 4° C. Nach zweimaligem Zentrifugieren (45 min bei 2700×g und 15 min bei 1700×g—2200×g) erhielten wir klare Lösungen, die sofort in $CO_2$-Acetongemisch eingefroren und bei —15° C bis zum Gebrauch gelagert wurden.

Die *Eiweißbestimmungen* wurden in den ersten informatorischen Versuchen mit der modifizierten Biuretmethode von Weichselbaum (abgeändert von Beisenherz et al. 1953) jedoch später als N-Bestimmungen (Mikrokjeldahlmethode mit Selen-Katalysator) vorgenommen.

Die *serologischen Methoden* stammen aus den zusammenfassenden Darstellungen von Kabat und Mayer (1948) und Cohn (1952). Zur Gewinnung von Antiseren wurden Kaninchen verwendet. Als Antigene dienten die oben beschriebenen Eiweißlösungen, die entweder unverändert oder nach Präzipitation mit Alaun [$KAL(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$] entsprechend dem von Kabat und Mayer (S. 543ff.) angegebenen Plan injiziert wurden. Vor Beginn der Injektionen wurde der Eiweißgehalt der Antigen-Lösungen bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten 6 Tage nach der letzten Injektion.

Die *quantitativen Präzipitations-Teste* wurden nach den von Kabat und Mayer (S. 20ff.) dargestellten Anweisungen ausgeführt.

Die *Agar-Teste der Seren* nach Ouchterlony (1949, 1950) führten wir gemäß den von Oudin (1952) zusammengestellten Vorschriften durch.

Den *Atmungsmessungen* in der Warburg-Apparatur lagen die methodischen Anweisungen von Umbreit et al. (1951) zugrunde. Der $O_2$-Verbrauch von Mixbrei aus Einzel- und Mischkulturen wurde bei 26° C in einem Zeitraum von 0—98 Std nach der Mischung in Intervallen von 4—6 Std bestimmt.

Ich danke Frau O. Poggendorf, Frl. I. Hansen und Frl. U. Hartmann, die mich nacheinander bei der Durchführung der Experimente unterstützten, für ihre umsichtige Hilfe.

## III. Versuchsergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen erhob sich die Frage, ob die Barragebildung und die SI durch Stoffe hervorgerufen werden, die [ähnlich wie die Sexualstoffe der Mucoraceen (Burgeff 1924, Plempel 1957, Plempel und Braunitzer 1958)] im Nährmedium von Hyphe zu Hyphe diffundieren. Für die SI ist dies sehr unwahrscheinlich, denn zwischen incompatiblen Trichogynen und Spermatien ist stets ein enger Kontakt vorhanden. Dagegen bedarf diese Frage bei der Barragebildung einer näheren Untersuchung.

### *1. Prüfung auf diffundierbare Barragestoffe*

Der Hyphenkontakt von $s$ und $a_1b_1$ -Myzelien mit verschiedenem Kreuzungstyp, die infolge ihrer genetischen Differenz durch die SI-Gene $ab/a_1b_1$ mit Barragebildung und SI reagieren, wurde in einer Länge von 4 cm verhindert. Dazu führten wir ein rechteckig geschnittenes Membranfilter senkrecht in das Agarmedium ein (s. Abb. 1).

Bei den 10 insgesamt durchgeführten Versuchen verwendeten wir Membranfilter nach Zsigmondy (Membranfilter AG, Göttingen) mit den maximalen Porenweiten von 400, 450 bzw. 500 m$\mu$, die eine Diffusion makromolekularer Substanzen ermöglichen.

Wie aus Abb. 1 zu entnehmen ist, entsteht eine Barrage nur in der Zone des Hyphenkontaktes. Längs des Filterstückes wachsen die Myzelien bis dicht an die Membran heran, ohne sich jedoch gegenseitig zu beeinflussen. Die Hyphen

können die Poren der Zellulosefilter nicht durchwachsen, denn es werden nur Fruchtkörper in den beiden filterfreien Zonen gebildet. Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die *Barragebildung* nicht durch ins Medium diffundierbare Stoffe hervorgerufen wird, sondern erst *bei unmittelbarem Kontakt der Hyphen erfolgt.*

Da zur Realisierung der beiden zu untersuchenden Erscheinungen (SI und Barragebildung) ein Hyphenkontakt erforderlich ist, haben wir versucht, Pilzmaterial in größeren Mengen zu gewinnen, in welchem infolge innigen Kontaktes der heterogenen Partner die Möglichkeit für den Ablauf beider Reaktionen gegeben ist. Dazu eignet sich die Kultur auf Agar-Nährböden nicht, da hier nur eine sehr schmale Kontaktzone vorhanden ist. Ein zweiter Nachteil der Agar-Kulturen liegt in der undefinierten Zusammensetzung dieser Nährböden. Beide Nachteile können durch die sog. „Mischkultur" ausgeschaltet werden.

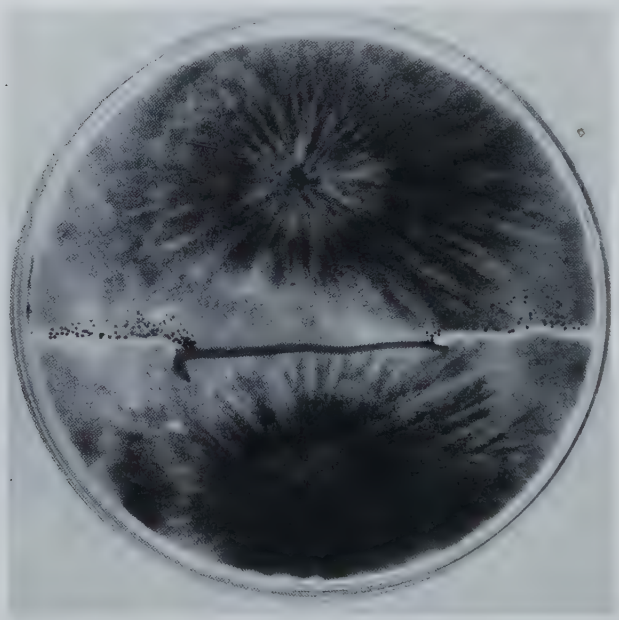


Abb. 1. Trennung der Myzelien $s$ + und $a_1b_1$— durch ein Membranfilter, das senkrecht in den Agar-Nährboden eingeführt wurde. Barrage- und Fruchtkörperbildung ist in der Zone des Hyphenkontaktes nur rechts und links neben der Membran zu beobachten (Verkl. 1,2 ×)

### *2. Die Mischkultur heterogener Stämme*

Zur Herstellung von Mischkulturen zogen wir die Pilzstämme in einem flüssigen, synthetischen Nährmedium getrennt an, zerkleinerten sie in einem Mixgerät und kultivierten sie vermischt in einem frischen Nährmedium weiter. Damit wurde erreicht, daß bei der Weiterzucht möglichst viele kleine Myzelpartikel der heterogenen Stämme im Verlauf des Wachstums in Kontakt gerieten. Als Kontrollen wurden die beiden Komponenten einer Mischkultur nach getrennter Anzucht getrennt gemixt und weiterkultiviert (= Einzelkulturen).

Bei der Planung dieser Versuche gingen wir von dem Gedanken aus, zunächst nach physiologischen Unterschieden zwischen Misch- und Einzelkulturen von Stämmen zu suchen, die sich durch möglichst viele SI- und Barrage-Gene unterscheiden. Diesen Anforderungen entsprachen die Stämme *s* und *M*. *s* trägt die SI-Gene *abcv* und die Barrage-Gene *tu*, *M* deren Allele $a_1b_1c_1v_1$ und $t_1u_1$. Wir nahmen an, daß mit dieser relativ großen genetischen Differenz die Wahrscheinlichkeit zur Auffindung physiologischer Verschiedenheiten gestiegen sei. Falls derartige Unterschiede gefunden würden, müßte ihre Reproduzierbarkeit an Misch- und Einzelkulturen von Stämmen überprüft werden, die nur Barragebildung zeigen. Entsprechend den Ergebnissen dieser Experimente könnte man entweder die SI- oder die Barrage-Gene für physiologische Unterschiede verantwortlich machen.

Um den Ablauf physiologischer Vorgänge zu verhindern, die vielleicht durch die Fruchtkörperbildung ausgelöst werden, verwendeten wir zu diesen Versuchen nur Stämme mit gleichem Kreuzungstyp ($s+$ und $M+$); denn sowohl die Barragebildung als auch die Wirkungen der SI-Gene sind vom Kreuzungstyp unabhängig (II, S. 40).

Bei Mischkultur von $s$- und $M$-Myzelien entstand auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein gallertartiger Myzelrasen, der wenige Lufthyphen und eine kaum wahrnehmbare Pigmentbildung aufwies. In Einzelkulturen von $s$ und $M$ bildeten sich grün-schwarze Myzelscheiben mit einem reichen Lufthyphengeflecht. Dieser makroskopisch wahrnehmbare Unterschied erinnert an die pigment- und lufthyphenfreie Barragezone, die man auf Agarkulturen erkennt. Man kann daher annehmen, *daß sich im Myzelbrei der Mischkulturen die gleichen Vorgänge abgespielt haben wie in der Barragezone*. Bevor geprüft wird, ob sich die Wirkungen der SI-Gene mit der Methode der Mischkultur erfassen lassen, sollen Beobachtungen und Versuche mitgeteilt werden, die eine genauere Charakterisierung der Barragebildung ermöglichen.

### *3. Die Pigmentbildung in Extrakten aus Mischkulturen*

Die Pigmente, die sich in den Myzelien von *P. anserina* unter bestimmten Kulturbedingungen bilden und sich in oder an den Wänden der Hyphen ablagern, konnten als Melanine bestimmt werden (Esser 1956b). Die Melaninsynthese, die in ihren Einzelheiten noch nicht abgeklärt ist, geht von den cyclischen Aminosäuren aus. Diese werden auf fermentativem Wege durch Phenoloxydasen zu den roten Hallachromen umgebaut. Aus den Hallachromen entstehen durch nichtfermentative Umsetzungen die Melanine.

Die Pigmentunterschiede, die zwischen Misch- und Einzelkulturen der Stämme $s$ und $M$ beobachtet wurden, zeigten sich auch in Extrakten, die wir aus lyophilisierten Myzelien herstellten. Die Extrakte aus Mischkulturen ($s/M$) waren hellgelb gefärbt, die aus Einzelkulturen ($s$ und $M$) braun. In den $s/M$-Extrakten entstand bei 26° C im Verlauf von 6—12 Std ein zunächst dunkelbrauner, dann schwarzer Farbstoff. Bei einer Temperatur von 4° C erfolgte die Pigmentbildung erst nach 3—4 Tagen. Die $s$- und $M$-Extrakte veränderten unter den gleichen Bedingungen und nach einer Lagerung von mehreren Wochen bei 4° C ihre Farbe nicht. Das gleiche Verhalten zeigte auch eine 1:1 Mischung von $s$- und $M$-Extrakten.

Die Pigmentbildung blieb aus, wenn die $s/M$-Extrakte erhitzt wurden (15 min auf 100°) oder ihr Eiweiß durch Zugabe von 3m-Trichloressigsäure ausgefällt wurde. Sie kann daher als ein fermentativer Vorgang aufgefaßt werden. Da die in $s/M$-Extrakten gebildeten Pigmente als Melanine bestimmt wurden, kann man annehmen, *daß die in Mischkulturen in vivo gehemmte Melaninsynthese nach Zerstörung des lebenden Organismus in vitro abgelaufen ist.*

In Extrakten aus Mischkulturen der Stämme $s$ und $u_1$ bzw. $M$ und $t$, die sich nur durch je ein Barragegen unterscheiden, erfolgte ebenfalls die Melaninbildung. *Die Hemmung der Melaninsynthese*, die in vivo beobachtet wurde, *muß* also *auf Wirkungen der Barrage-Gene zurückgeführt werden.*

Bei einer Deutung dieses Phänomens könnte man zunächst vermuten, daß die Phenoloxydasen in Mischkulturen nicht in aktiver Form vorliegen. Dies scheint nicht der Fall zu sein, denn frisch hergestellte Extrakte aus Einzel- und Mischkulturen zeigten beide eine hohe Dopa-Oxydase-Aktivität.

In einer 1:1 Mischung von Myzelextrakt mit einer m/30 Dopa-Lösung war die Bildung der Hallachrome nach 10—15 min abgeschlossen. Die Messungen wurden nach der Methode von SUSSMAN und MARKERT (1953) colorimetrisch mit Hilfe eines „Eppendorf-Photometers" bei einer Wellenlänge von 436 m$\mu$ durchgeführt.

Es liegt also nahe, anzunehmen, daß die *Pigmentbildung trotz Anwesenheit funktionsfähiger Enzyme in Mischkulturen gehemmt wird. Das Hemmprinzip scheint seine Wirksamkeit nach Zerstörung der lebenden Zellen langsam zu verlieren*, denn die Farbstoffe entstehen in vitro bei 26° C im Verlauf von 6—12 Std.

In Einzelkulturen ist dagegen die Farbstoffbildung in vivo zum Abschluß gekommen. Die Melanine sind in den Zellen abgelagert worden und bei Herstellung der Extrakte infolge ihrer geringen Wasserlöslichkeit nach dem Zentrifugieren meist im Bodensatz zurückgeblieben. Die Braunfärbung der Extrakte aus Einzelkulturen beruht demnach auf der Schwerlöslichkeit der Melanine.

### *4. Analyse der Mischkulturen*

Ausgehend von der Tatsache, daß die SI-Gene der *s*-Kerne einen wachstumshemmenden Einfluß auf die Kerne des Stammes *M* haben (II S. 37ff.), wäre es möglich, daß in Misch- (*s*/*M*) und Einzelkulturen (*s* oder *M*) unterschiedliche Myzelmengen gebildet würden. *Trockengewichtsbestimmungen* erbrachten keinen gesicherten Unterschied zwischen *s*/*M* einerseits und *s* oder *M* andererseits. Daraus kann nur geschlossen werden, daß größere Unterschiede in der gebildeten Myzelmenge nicht vorhanden sind.

Kleinere Differenzen im Trockengewicht können nicht erfaßt werden, da im Myzelbrei infolge der Anzucht in verschiedenen Kolben geringe Schwankungen bezüglich der Myzelmenge nicht ausgeschlossen werden können. Dies kam zum Ausdruck in der großen Variabilität der Einzelmeßwerte der verschiedenen Serien.

Die *Atmungsvorgänge* scheinen ebenfalls nicht von der Wirkung der SI- und Barragegene im Mixbrei beeinflußt zu werden. Manometrische Messungen in der Warburg-Apparatur zeigten keine gesicherten Unterschiede im $O_2$-Verbrauch (bezogen auf das Trockengewicht) zwischen Einzel- und Mischkulturen.

In der nächsten Versuchsreihe haben wir nach Unterschieden im *Eiweißstoffwechsel* der Einzel- und Mischkulturen gesucht. Aus lyophilisiertem Pilzmaterial von Misch- (*s*/*M*) und Einzelkulturen (*s* und *M*) wurden Extrakte hergestellt, deren Eiweißgehalt quantitativ bestimmt wurde. Die Analyse von 5 verschiedenen Aufarbeitungen ergab für den Eiweißgehalt der Extrakte die folgenden Mittelwerte, die in mg/ml angegeben werden: *s*: $1{,}94 \pm 0{,}11$; *M*: $1{,}99 \pm 0{,}15$; *s*/*M*: $1{,}38 \pm 0{,}13$. Diese Zahlenwerte deuten darauf hin, daß *in Mischkulturen weniger extrahierbare Proteine gebildet werden als in Einzelkulturen*. Es erschien notwendig, diese Unterschiede in der Eiweißproduktion durch spezifischere Methoden zu erfassen. Dazu gingen wir zu serologischen Testen über.

Zur Prüfung, ob die Hemmung der Eiweißsynthese in Mischkulturen durch die Wirkung der Barrage- oder SI-Gene ausgelöst wird, zogen wir die Stämme $+s$ und $+u_1$, welche untereinander nur durch Barragebildung reagieren, als Einzel- und Mischkulturen an. Die Eiweißbestimmungen führten wir an Extrakten aus Mischkulturen und einer 1:1-Mischung der Extrakte aus Einzelkulturen durch. Die Mittelwerte von zwei Aufarbeitungen ergaben: Mischkultur $s/u_1$: $2{,}48 \pm 0{,}13$ mg/ml; Einzelkultur $s + u_1$: $2{,}52 \pm 0{,}09$ mg/ml. Da sich eine Differenz zwischen den Eiweißbestimmungen aus Einzel- und Mischkulturen von *s* und $u_1$ nicht absichern läßt, *kann man vermuten, daß die Hemmung der Eiweißsynthese in den Mischkulturen s/M auf eine Wirkung der SI-Gene zurückzuführen ist.*

*5. Serologische Analyse von Extrakten aus Einzel- und Mischkulturen der Genotypen s und M*

Zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten wir als Antigene Extrakte aus lyophilisiertem Pilzmaterial, und zwar:

1. das Antigen $s\,M$ = Extrakt aus Mischkulturmyzel von *s* und *M*, injizierte Gesamteiweißmenge 138 mg;

2. das Antigen $s+M$ = Myzelextrakt aus Einzelkulturen von *s* und *M* (vor der Extraktion wurden *s* und *M* Myzelpulver im Verhältnis 1:1 vermischt), injizierte Gesamteiweißmenge 150 mg.

Die nach Abschluß der Injektionen gewonnenen Antiseren $s/M$ und $s+M$ wurden zunächst mit Hilfe des Ringtestes gegen die homologen und heterologen Antigene geprüft. In allen Kombinationen konnte eine starke Ringbildung beobachtet werden. Quantitative Unterschiede waren mit dieser relativ groben Methode nicht festzustellen. Zur weiteren Analyse der Seren benutzten wir daher empfindlichere Methoden:

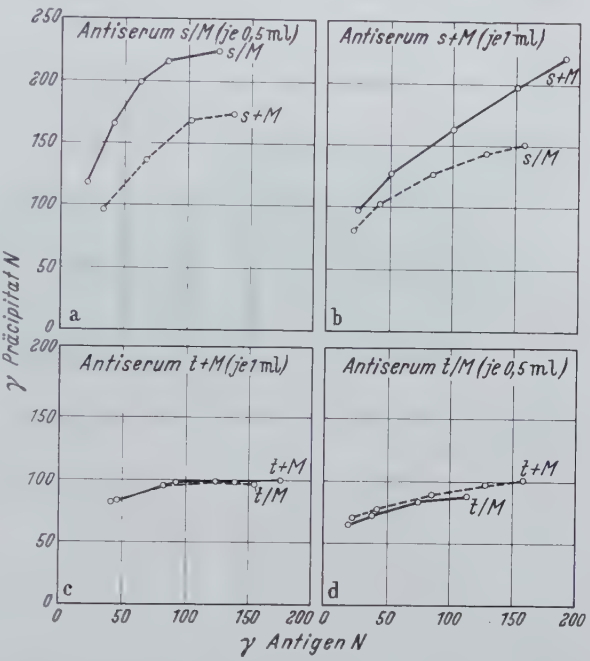



Abb. 2 a—d. Präzipitatmenge (Ordinate), die aus gleichen Volumina eines Antiserums nach Zugaben von steigenden Mengen Antigen (Abszisse) ausgefällt wird. Die nach Zugabe von homologem Antigen erhaltenen Werte sind durch ausgezogene Linien, die bei Verwendung von heterologem Antigen erhaltenen Werte durch gestrichelte Linien verbunden. (Näheres s. Text)

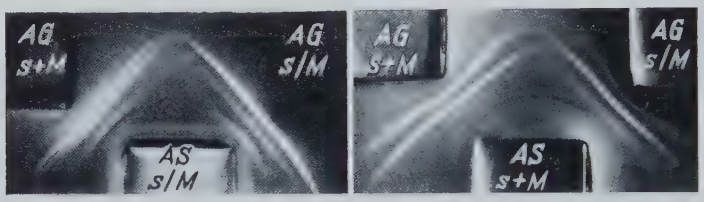
*a) Analyse der Antiseren durch Präzipitations-Teste.* Mit den Antiseren $s/M$ und $s+M$ wurden je drei Präzipitationsversuche durchgeführt. Die Ergebnisse von je einem dieser Experimente sind in Abb. 2a u. b dargestellt. Die übrigen Versuche ergaben ähnliche Werte. Aus der Abb. 2 ist zu ersehen, daß in beiden Seren nach Zugabe der homologen Antigene größere Präzipitatmengen gebildet werden als nach Zufügung der heterologen Antigene. Aus dieser Reziprokität der Versuchsergebnisse kann man entnehmen, daß *spezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der aus Einzel- und Mischkulturen gewonnenen Eiweiße bestehen.* Offenbar wird durch die gemeinsame Kultur von *s*- und *M*-Myzelien nicht nur die Menge des gebildeten Eiweißes (s. S.450), sondern auch die Eiweißspezifität verändert.

*b) Analyse der Antiseren durch Agar-Diffusions-Teste.* Mit den Seren $s/M$ und $s+M$ führten wir 18 bzw. 22 Diffusionsteste mit verschiedenen Chargen der homologen und heterologen Antigene durch. In allen Experimenten bildete das Antigen $s+M$ mit den beiden Seren zwei scharf getrennte Banden.

Dagegen zeigte sich bei Verwendung des Antigens $s/M$ in beiden Fällen nur eine Bande (Abb. 3). *Die Entstehung der Präzipitationsbanden ist also bezüglich der homologen und heterologen Kombinationen nicht reziprok.*

In allen Antigen-Antiserum-Kombinationen traten noch zusätzlich zwei mehr oder weniger deutlich erkennbare Banden auf, die auch nach mehrfachem Nachfüllen mit Antigen nicht schärfer hervortraten. Nach OUDIN (S. 371ff.) ist es möglich, daß solche Banden auf Artefakten beruhen; sie wurden deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Für die Diffusions-Teste kann man auch Seren mit äußerst niedrigen Titern verwenden. Daher war es möglich, diese Versuche auf Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Wir hatten nämlich in einem Vorversuch nach Immunisierung eines anderen Kaninchen-Paares $s/M$- und $s+M$- Seren erhalten, die infolge ihres niedrigen Antikörper-Titers sich nicht für die Präzipitationsversuche eigneten. 9 Diffusionsteste mit diesem $s/M$- bzw. 8 mit dem $s+M$- Serum führten zu den gleichen Ergebnissen wie in den oben beschriebenen Hauptversuchen.




a b

Abb. 3 a u. b. Agar-Diffusions-Teste von Antiserum $s/M$ (a) und Antiserum $s+M$ (b) gegen die homologen und heterologen Antigene. *AS* Antiserum, *AG* Antigen. (Näheres s. Text)

Vor einem Versuch, diese Befunde zu erklären, erscheinen noch die folgenden Überlegungen notwendig:

1. Da in allen Experimenten die beiden mit dem Antigen $s+M$ erzielten Banden in die durch das Antigen $s/M$ präzipitierte Bande übergehen (s. Abb. 3), kann man annehmen (OUDIN S. 373), daß es sich um gleichartige Präzipitatbildungen handelt. Dies bedeutet, daß die Hauptmenge der gebildeten Antikörper in beiden Seren sich nicht durch das Antigen $s/M$ in zwei Fraktionen aufteilen läßt, sondern in ihrer Gesamtheit in Form einer Bande ausfällt.

2. Aus der Vereinigung der beiden $s+M$- Banden mit der $s/M$- Bande geht gleichfalls hervor, daß die unterschiedliche Zahl der Banden nicht auf Konzentrationsunterschieden der Antigene beruht. In einem solchen Falle würden nämlich die Banden der verschiedenen Antigene nicht fusionieren.

Eine *Erklärungsmöglichkeit* für die Tatsache, daß die beiden Seren gegenüber den verschiedenen Antigenen gleichartig reagieren, erblicken wir daher in der Annahme, daß die Proteine der $s/M$- und $s+M$- Antigene zwar die gleichen determinanten Gruppen besitzen, die jedoch auf verschiedenen Trägern lokalisiert sind. Im ersten Falle ($s/M$) haben die beiden Eiweißträger die gleiche Diffusionsgeschwindigkeit. Sie werden von den Antikörpern als eine Bande präzipitiert. Im zweiten Falle (Antigen $s+M$) besitzen die Träger der determinanten Gruppen verschiedene Diffusionsgeschwindigkeit, es entstehen zwei Präzipitatbanden.

Somit läßt sich das *unterschiedliche Verhalten der Antigene $s/M$ und $s+M$ auf eine im Verlauf der Mischkultur erfolgte Änderung der physikalischen Eigenschaften der s- und M-Proteine zurückführen.*

Es erhebt sich nun die Frage, ob diese durch die serologischen Versuche nachgewiesenen Proteindifferenzen nach Misch- und Einzelkultur der

Genotypen *s* und *M* durch die Barragegene oder durch die SI-Gene ausgelöst werden. Um diese Fragestellung zu prüfen, führten wir die gleichen serologischen Versuche mit Extrakten aus Einzel- und Mischkulturen von Stämmen durch, die sich nur durch ein Barrage-Gen unterscheiden.

### *6. Serologische Analyse von Extrakten aus Einzel- und Mischkulturen der Genotypen M und t*

Der Stamm *M* unterscheidet sich vom Stamm *t* nur durch das Barrage-Gen $t_1$. Kaninchen wurden mit Mischkulturextrakt ($t/M$) bzw. Extrakt aus Einzelkulturen ($t+M$) immunisiert. In beiden Fällen betrug die injizierte Gesamteiweißmenge etwa 120 mg.

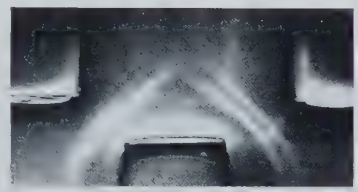


Abb. 4. Agar-Diffusionsteste von Antiserum $t+M$ (Mitte) gegen die Antigene $t/M$ (links oben) und $t+M$ (rechts oben). Das gleiche Bild, nämlich je zwei Banden in der homologen und in der heterologen Kombination, erhält man auch, wenn man anstelle des Antiserums $t+M$ das Antiserum $t/M$ verwendet

Die Seren $t/M$ und $t+M$ ergaben im Ringtest in allen Kombinationen mit den beiden Antigenen starke Ringbildung. Aber *weder durch Präzipitationsteste noch durch Diffusionsteste ließen sich Unterschiede zwischen den Antigenen $t/M$ und $t+M$ nachweisen.* Bei den Präzipitationsversuchen wurden aus beiden Seren durch die homologen und heterologen Antigene (je 3 Versuche) annähernd die gleichen Proteinmengen (Abb. 2c u. d) ausgefällt. In den Diffusionsversuchen (je 8 Teste) traten in allen Kombinationen je zwei Banden auf (Abb. 4).

Aus diesen Versuchen kann man den Schluß ziehen, daß *die von den SI-Genen ausgehenden Wirkungen für die in den Mischkulturen auftretenden Veränderungen der Spezifität und der physikalischen Eigenschaften der Proteine verantwortlich* sind.

## IV. Besprechung der Versuchsergebnisse

Die *Bildung einer Barrage*, die zwischen Myzelien verschiedener Rassen von *Podospora anserina* zu beobachten ist, kann schon durch eine monogene Differenz der Partner ausgelöst werden. *Durch ein Zusammenwirken der beiden Gene eines Barrage-Allelenpaares* (z. B. $t/t_1$) wird in der Kontaktzone der *t*- und $t_1$-Myzelien die Melaninbildung verhindert. Wir konnten nachweisen, daß das *Prinzip dieser Reaktion* in einer *Hemmung der Aktivität der* für die Melaninbildung verantwortlichen *Polyphenoloxydasen* besteht, die allerdings nur in der engen Zone des Hyphenkontaktes auftritt. Das *Hemmprinzip verliert seine Wirksamkeit nach Zerstörung der lebenden Zellen*, denn in Extrakten von vermischt kultivierten Barragebildnern erfolgt die in vivo gehemmte Melaninbildung in vitro.

Das Ausbleiben von Melaninbildung ist bei Pilzen schon mehrfach genetisch und physiologisch untersucht worden:

Markert (1950) konnte von dem Ascomyceten *Glomerella cingulata* monogene Mutanten herstellen, die Melaninpigmente nur in geringen Mengen oder gar nicht ausbilden. Die Störungen der Pigmentsynthese ließen sich auf die unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen Mutanten zurückführen, das Ferment Tyrosinase zu bilden. Bei einigen Mutanten war mit diesen Fermentdefekten eine partielle oder totale Sterilität verbunden.

Die gleichen Phänomene ließen sich sowohl an *G. cingulata* als auch an *Neurospora crassa* durch Veränderungen von Außenbedingungen (Nährmedium und Temperatur) auslösen OWEN und MARKERT 1954, HOROWITZ und SHEN 1952, HIRSCH 1954, WESTERGAARD und HIRSCH 1954).

Auch für *Podospora anserina* ist bekannt, daß die Melaninbildung unterbleiben kann, wenn bestimmte Gene mutieren oder die Hexosekonzentration des Nährmediums sehr gering ist (ESSER 1956c bzw. b). Sterilitätserscheinungen sind damit jedoch nicht verknüpft.

Wenn man diese Befunde mit unseren Versuchsergebnissen über die Genphysiologie der Barragebildung vergleicht, ergibt sich eine grundlegende Differenz bezüglich des Genmechanismus, der die Hemmung der Melaninsynthese bedingt. Abgesehen von den Störungen der Pigmentbildung durch Außenbedingungen, sind in den oben geschilderten Beispielen für die Blockierung der Farbstoff-Synthese stets mutierte Gene verantwortlich, welche die Bildung der Phenoloxydasen mehr oder minder unterdrücken. Dagegen ist die *Barragebildung bei Podospora das Resultat eines Zusammenwirkens von zwei Wildgenen, deren Genwirkung in Einzelkulturen nicht zu erkennen sind.* Die Barrage-Gene manifestieren sich nur, wenn sie in den Kernen von sich berührenden Hyphen lokalisiert sind. Ist ein derartiger Hyphenkontakt nicht gegeben, so unterbleibt jeglicher Einfluß der Barrage-Gene auf die Melaninbildung.

Da die *Barrage-Faktoren keine Defektgene* sind, ist auch verständlich, daß sie nicht die Melaninsynthese behindern, indem sie die Bildung der Phenoloxydasen unterdrücken, sondern daß sie die Aktivität der reichlich vorhandenen Enzyme durch die Bildung eines Hemmstoffes beeinträchtigen. Über die chemische Natur dieses Hemmprinzips, das in Extrakten sehr rasch seine Wirksamkeit verliert, ist noch nichts bekannt.

Eine Parallele zu den bei *Neurospora* und *Glomerella* in Verbindung mit dem Ausbleiben der Melaninbildung beobachteten Sterilitätserscheinungen bildet die Tatsache, daß in der Barragezone von Podospora keine Fruchtkörper entstehen.

Die reziproke Compatibilität von zwei Kreuzungspartnern wird dadurch jedoch in keiner Weise beeinflußt, denn die Perithezien entstehen zu beiden Seiten der pigmentfreien Zone in reichem Maße.

Diese Korrelation zwischen dem Fehlen von Melaninpigmenten und dem Ausbleiben der Fruchtkörperbildung besteht bei *Podospora* jedoch nur bezüglich der Wirkungen der Barragegene, denn einerseits pigmentieren sich einige sterile Mutanten stärker als die fertilen Wildstämme, und andererseits sind farblose Mutanten nicht immer steril (ESSER 1956c).

In diesem Zusammenhang möchten wir noch auf ein Phänomen hinweisen, das im Gegensatz zur Barragebildung in einer positiven Stimulierung der Melaninsynthese besteht: Zwei Wildstämme von *Neurospora crassa*, die etwa die gleiche Tyrosinaseaktivität besitzen, zeigen bei Kreuzungen in der Kontaktzone eine erhöhte Fermentaktivität und demzufolge eine stärkere Melaninbildung (KUWANA 1956, 1958). Es ist interessant, daß diese Erscheinung ebenfalls nur bei unmittelbarem Hyphenkontakt auftritt und nicht durch Stoffe ausgelöst wird, die ins Nährmedium diffundieren. Diese Steigerung der Melaninbildung kann auf eine additive Genwirkung der für die Pigmentbildung verantwortlichen Gene der heterogenen Stämme zurückgeführt werden.

Nicht nur die Barragebildung, sondern auch die *heterogenische Incompatibilität*, die sich im einfachsten Fall als Semi-Incompatibilität manifestiert, *wird durch ein Zusammenwirken verschiedener Gene ausgelöst.* Die durch die SI-Gene zusätzlich zur Barragebildung hervorgerufene sexuelle Unverträglichkeit findet ihren

Ausdruck in einer Herabsetzung der Vermehrungsfähigkeit der Kerne des einen Kreuzungspartners (II S. 37ff.). Durch eine vergleichende physiologische Analyse semi-incompatibler Myzelien, die unter gleichen Bedingungen einzeln oder vermischt kultiviert wurden, gelang der Nachweis, daß die *Genwirkungen der SI-Gene in erster Linie den Eiweißstoffwechsel stören.* Sie scheinen nämlich in *Mischkulturen eine Reduktion des Gesamteiweißes* herbeizuführen. *Die in Mischkulturen gebildeten Proteine unterscheiden sich außerdem serologisch von den Eiweißen, die bei Einzelkultur der Kreuzungspartner entstehen.* Da für die Barrage-Gene allein eine derartige Beeinflussung der Eiweißsynthese nicht nachgewiesen werden konnte, muß es sich bei diesen Erscheinungen um *spezifische Wirkungen der Semi-Incompatibilitäts-Gene* handeln.

Die Ergebnisse der genphysiologischen Untersuchungen ergänzen somit die in Teil II dieser Veröffentlichungsreihe beschriebenen Befunde über die Wirkungsweise der SI-Gene; denn *die Asymmetrie der Befruchtungsvorgänge, die auf die* im genetischen Experiment beobachtete *Unverträglichkeit bestimmter Kombinationen der SI-Gene zurückzuführen ist, scheint sich physiologisch als eine Veränderung der Eiweißspezifität zu manifestieren.* Die Resultate dieser Untersuchungen ermöglichen es ferner, auch *in physiologischer Hinsicht zwischen den von den SI-Genen und den von den Barragegenen ausgehenden Wirkungen zu unterscheiden.*


## Summary

Physiological investigations led to a characterization of the gene actions responsible for barrage-formation and semi-incompatibility.

1. Diffusible substances are not responsible for the barrage phenomenon, which can be produced even by a monogenic difference of two mycelia, a barrage is formed only after a contact of different hyphae.

2. By a co-operation of both alleles of a barrage locus the synthesis of melanins is inhibited in the zone of contact in spite of presence of phenoloxydases. After destruction of the living cells the inhibition-system loses its activity and the synthesis of melanins can be observed in vitro.

3. The semi-incompatibility, which can be brought about by any one of several pairs of loci, is manifested physiologically as an inhibition of protein-synthesis. In addition there is a serologically demonstrable modification of the protein specificity.


## Literatur


Beisenherz, G., H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerphosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555—577 (1953). — Burgeff, H.: Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei *Mucorineen.* Bot. Abh. **4**, 135 S. (1924). — Cohn, M.: Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction. Meth. med. Res. **5**, 301—335 (1952). — Esser, K.: Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina (Ces.) Rehm.* I. Genetische Analyse der Semi-Incompatibilität. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 595—624 (1956a). — Wachstum, Fruchtkörper- und Pigmentbildung von *Podospora anserina* in synthetischen Nährmedien. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **26**, 103—116 (1956b). — Gen-Mutanten von *Podospora anserina (Ces.) Rehm* mit männlichem Verhalten. Naturwiss. **43**, 284 (1956c). — Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina (Ces.) Rehm.* II. Die Wirkungsweise der Semi-Incompatibilitäts-Gene. Z. Vererb.-Lehre **90**,

29—52 (1959a). — Die Incompatibilität. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 18. 1959b. (Im Druck.) — Hirsch, H. M.: Enviromental factors influencing the differentiation of Protoperithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in *Neurospora crassa*. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 72—97 (1954). — Horowitz, N. H., and S. C. Shen: *Neurospora* tyrosinase. J. biol. Chem. **197**, 513—520 (1952). — Kabat, E. A., and M. M. Mayer: Experimental Immunochemistry. Springfield, Ill. 1948. — Kuwana, H.: Mating-type alleles and tyrosinase activity in relation to genetic background in *Neurospora crassa*. Ann. Rep. Sci. works, Fac. Sci. Osaka Univ. **4**, 117—131 (1956). — Melanization in the mycelium due to the interaction of two strains of *Neurospora crassa*. Bot. Mag. (Tokyo) **71**, 271—274 (1958). — Markert, C. L.: The effects of genetic changes on tyrosinase activity in *Glomerella*. Genetics **35**, 60—75 (1950). — Oudin, J.: Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. Meth. med. Res. **5**, 335—378 (1952). — Owen, R. D., and C. L. Markert: Effects of antisera on tyrosinase in *Glomerella* extracts. J. Immun. **74**, 257—269 (1954). — Plempel, M.: Die Sexualstoffe der *Mucoraceae*, ihre Abtrennung und die Erklärung ihrer Funktion. Arch. Mikrobiol. **26**, 151—174 (1957). — Plempel, M., u. G. Braunitzer: Die Isolierung der *Mucorineen*-Sexualstoffe I. Z. Naturforsch. **13**b, 302—305 (1958). — Rizet, G.: Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétiques des barrages entre souches *S* et *s*. Rev. Cytol. et Biol. véget. **13**, 51—91 (1952). — Sussmann, A. S., and C. L. Markert: The development of tyrosinase and cytochrome oxydase activity in mutants of *Glomerella cingulata*. Arch. Biochem. **45**, 31—40 (1953). — Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer: Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis (Minn, USA) 1951. — Westergaard, M., and H. Hirsch: Environmental and genetic control of differentiation in *Neurospora*. Proc. of the seventh Symp. of Colston Res. Soc. **7**, 171—183 (1954). — Westergaard, M., and H. K. Mitchell: *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Amer. J. Bot. **34**, 573—577 (1947).

Privatdozent Dr. Karl Esser, Botanisches Institut der Universität Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 457—462 (1959)

Aus dem Institut für Genetik der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem
(Direktor: Prof. Dr. H. Lüers)

# MUTAGENITÄTSUNTERSUCHUNGEN MIT 1,4-DIMETHYLSULFONOXY-1,4-DIMETHYLBUTAN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

Gunter Röhrborn

*(Eingegangen am 29. Oktober 1959)*

1,4-Dimethylsulfonoxy-1,4-dimethylbutan (CB 2348) ist das von Timmis und Hudson (1958) entwickelte Dimethyl-Homologe des Myleran (CB 2041, 1,4-Dimethylsulfonoxybutan) und wird gewöhnlich kurz als Dimethyl-Myleran bezeichnet. Ebenso wie Myleran wirkt es vorzugsweise auf die Blutzellen der myeloischen Reihe, es eignet sich deshalb besonders für die Chemotherapie chronischer myeloischer Leukämien. Bei Ratten wurde nachgewiesen, daß es die Anzahl der Neutrophilen im Blut zwei- bis dreimal stärker herabsetzt als Myleran (Elson 1958, Talbot u. Elson 1958). Die klinische Erprobung von Dimethyl-Myleran erfolgte durch Galton u. Mitarb. (1958) sowie durch Bierman u. Mitarb. (1958); es wirkte wesentlich rascher als Myleran.

Dimethyl-Myleran gehört zu den sog. radiomimetischen alkylierenden Verbindungen, deren biologische Wirkung biochemisch durch eine Reaktion mit gewissen nucleophilen Gruppen in der Zelle ausgelöst wird (Ross 1953 und 1958, Stacey u. Mitarb. 1958). Cytologisch wurde der radiomimetische Charakter von Dimethyl-Myleran und anderen Myleran-Homologen von Koller (1958) an Zellen des *Walker*-Carcinoms aufgezeigt.

In früheren eigenen Untersuchungen an *Drosophila* konnte die mutagene Wirkung von Myleran nachgewiesen werden (Röhrborn 1959). Ebenfalls mutagen wirkte von den Hydrolyse(zwischen)produkten des Myleran der 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester. Andere Hydrolyseprodukte wie Methylsulfonsäure und 1,4-Butandiol, die unter physiologischen Bedingungen keine Alkylierungsfähigkeit besitzen, erwiesen sich als nicht mutagen.

Da Dimethyl-Myleran zwei- bis dreimal stärker cytostatisch wirkt und in seiner biologischen Wirksamkeit einem anderen Alkylierungsmechanismus unterliegen soll als Myleran (Ross, pers. Mitt., Timmis u. Hudson 1958), erschien es uns von Interesse, Dimethyl-Myleran unter dem Gesichtspunkt zu prüfen, ob seine mutagene Wirkung in entsprechendem Maße die des Myleran übertrifft.

## Material und Methodik

1,4-Dimethylsulfonoxy-1,4-dimethylbutan (CB 2348, Dimethyl-Myleran) ist ein weißes Pulver und schwach löslich in Wasser und Alkohol. In den Mutagenitätsuntersuchungen wurde es jeweils an ein bis drei Tage alte Männchen des Stammes „Berlin wild" der Spezies *Drosophila melanogaster* nach der Methode von Lüers (1953) verfüttert; und zwar in Form einer 0,0023%igen Lösung bzw. als 1%ige Suspension in 5%igem Zuckerwasser. Die Behandlungsdauer betrug stets drei Tage. Parallel dazu wurde aus Vergleichsgründen unter

denselben Bedingungen eine 1%ige Suspension von Myleran (CB 2041, 1,4-Dimethylsulfonoxybutan)[1], welches noch schwerer löslich ist, appliziert.

Die Raten der rezessiven letalen Mutationen des X-Chromosoms von *D. melanogaster* wurden mit der *Muller-5*-Methode bestimmt. Nach Abschluß der Behandlung erfolgte sofort die Paarung der Männchen mit je einem virginen *Muller-5*-♀ für die Dauer von drei Tagen. Zur Beurteilung der Sensibilität des Spermatogenesezyklus wurden die behandelten Männchen in Abständen von drei Tagen jeweils mit einem neuen unbefruchteten *Muller-5*-♀ gepaart. Die Nachkommenschaft jedes Männchens wurde getrennt weitergeführt, um auftretende Gruppen von Mutationen erfassen und auf ihre Identität prüfen zu können. Dieser Test erfolgte mittels Lokalisation der betreffenden Mutationen nach dem Rückkreuzungsverfahren mit einem *Xple*-Stamm, dessen Geschlechtschromosom die Markierungsgene *sc ec ct v g f* enthielt. Bei diesen Lokalisationsuntersuchungen wurden stets mehr als 200 Männchen und sämtliche Weibchen protokolliert.

## Versuchsergebnisse

**1. Die mutagene Wirkung von Dimethyl-Myleran.** In den Mutagenitätsuntersuchungen mit einer 0,0023%igen Lösung von Dimethyl-Myleran zeigte sich gegenüber den Zuckerwasserkontrollen (0,10%) eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung der Letalmutationsrate (Tabelle 1a). Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die Dosis beträchtlich erhöht. Schon in früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß chemische Substanzen zur genetischen Prüfung mit Erfolg in suspendierter Form verabreicht werden können. Diese Applikationsart wurde daher auch hier angewendet.

Die Verabfolgung einer 1%igen Suspension von Dimethyl-Myleran in 5%igem Zuckerwasser löste eine starke und gesicherte Erhöhung der Letalmutationsrate im X-Chromosom von *D. melanogaster* aus (Tabelle 1b).

Eine vergleichsweise verfütterte 1%ige Suspension von Myleran in 5%igem Zuckerwasser erwies sich ebenfalls als signifikant mutagen (Tabelle 1c). Stellt man die zusammengefaßten Serien I—IV der beiden Versuche mit Dimethyl-Myleran und die Serien I—IV des Myleran-Experimentes einander gegenüber, so erkennt man, daß Dimethyl-Myleran unter gleichen Bedingungen etwa dreimal stärker mutagen wirkt als Myleran. Dieser Befund wird bereits bei einem Vergleich korrespondierender Einzelserien sichtbar. Dabei ist zu vermerken, daß die 1%ige Suspension von Myleran wegen des geringeren Molekulargewichtes ($M$ = 246, 310) mehr Moleküle enthält als die entsprechende Suspension von Dimethyl-Myleran ($M$ = 274, 364).

**2. Die Sensibilität des Spermatogenesezyklus.** Das Niveau der Mutationsraten ist in den ersten vier bzw. fünf Zuchtserien etwa gleichmäßig hoch und sinkt in den späteren Serien drastisch und irreversibel ab. Die Differenzen zwischen den Werten der Serien I—V und denen der Serien VI—X beider Experimente sind signifikant. Diese Befunde lassen sich so interpretieren, daß postmeiotische Stadien wesentlich empfindlicher gegenüber Dimethyl-Myleran sind als prämeiotische Stadien der Spermatogenese. Unterschiede in der Sensibilität der einzelnen postmeiotischen Stadien sind nicht festzustellen, wie ein Vergleich der ersten Serien zeigt.

[1] Herrn Prof. Dr. A. HADDOW, Chester Beatty Research Institute sowie der Firma Burroughs Wellcome & Co., beide London, sei für die Überlassung des Dimethyl-Myleran bzw. Myleran herzlich gedankt.

Auch die lokalisationsgenetische Analyse mehrerer Mutationsgruppen aus den Serien II und III brachte keinen Hinweis auf eine Mutabilität prämeiotischer Stadien. Für 13 Letalmutationen aus 6 Nestern konnte die Identität und damit die gemeinsame Ursache der Mutation einer prämeiotischen Keimzelle einwandfrei ausgeschlossen werden. Von diesen Mutationen erwiesen sich 12 als Punktmutationen und eine als Chromosomenaberration.

**3. Die sterilisierende Wirkung von Dimethyl-Myleran.** Beim *Muller-5*-Verfahren entspricht die Anzahl der geprüften X-Chromosomen in den einzelnen Serien der Menge der Töchter der behandelten Männchen. Der Fertilitätsgrad dieser Männchen kann demnach direkt aus jenen Werten abgelesen werden. Dabei gilt es jedoch zu berücksichtigen, wie viele Männchen in einen Versuch eingebracht wurden und wie groß deren Absterberate im Verlauf der aufeinanderfolgenden Zuchtserien war.

Ein Vergleich der Serien I—IV der Experimente mit Dimethyl-Myleran und Myleran unter Berücksichtigung der Anzahl der P-♂♂ (Tabelle 2) läßt in allen Serien die gesichert schwächere Fertilität der mit Dimethyl-Myleran behandelten Fliegen erkennen ($P$ jeweils $<0{,}0027$). Auch in dem Versuch mit einer 0,0023%igen Lösung

Tabelle 1. *Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Mutationen nach Behandlung mit Dimethyl-Myleran und Myleran*

| Serie Nr. | Zahl der geprüften X-Chromosomen | Zahl der letalen Mutationen | Prozentsatz der letalen Mutationen |
|---|---|---|---|
| a) 0,0023%ige Lösung von Dimethyl-Myleran in Zuckerwasser[1] | | | |
| I | 1116 | 4 | 0,36 |
| II | 906 | 3 | 0,33 |
| III | 579 | 2 | 0,35 |
| b) 1%ige Suspension von Dimethyl-Myleran in Zuckerwasser 1. Versuch | | | |
| I | 559 | 28 | 5,01 |
| II | 526 | 34 | 6,46 |
| III | 172 | 15 | 8,73 |
| IV | 31 | 2 | 6,45 |
| V | 27 | 1 | 3,70 |
| VI | 25 | — | — |
| VII | 60 | — | — |
| VIII | 50 | — | — |
| IX | 23 | — | — |
| X | 18 | — | — |
| I—V | 1315 | 80 | $6{,}08 \pm 0{,}66$ |
| 2. Versuch | | | |
| I | 831 | 49 | 5,90 |
| II | 955 | 62 | 6,49 |
| III | 526 | 28 | 5,32 |
| IV | 118 | 6 | 5,08 |
| V | 33 | — | — |
| VI | 30 | — | — |
| VII | 86 | 1 | 1,16 |
| VIII | 20 | — | — |
| IX | 37 | — | — |
| X | 34 | — | — |
| I—V | 2463 | 145 | $5{,}89 \pm 0{,}47$ |
| VI—X | 207 | 1 | $0{,}48 \pm 0{,}47 \left(<\frac{3{,}59}{0{,}002}\right)^2$ |
| I—IV (1. + 2.) | 3718 | 224 | $6{,}00 \pm 0{,}39$ |
| c) 1%ige Suspension von Myleran in Zuckerwasser | | | |
| I | 1263 | 25 | 1,98 |
| II | 1080 | 23 | 2,13 |
| III | 978 | 17 | 1,74 |
| IV | 867 | 5 | 0,58 |
| I—IV | 4188 | 70 | $1{,}65 \pm 0{,}20$ |

[1] Substanz unvollständig gelöst.

[2] Bei geringer Anzahl von Mutationen ist die Angabe des mittleren Fehlers ($\pm m$) ungenau. Deshalb wurden in diesem Fall in Klammern die jeweiligen oberen und unteren Grenzen nach Stevens (1942) für 99%ige Sicherheit ($\sim 2{,}576$ m) aufgeführt.

von Dimethyl-Myleran (Tabelle 1a) wurde ein Absinken der Fertilität beobachtet. Dies könnte darauf deuten, daß Dimethyl-Myleran bereits in Dosen, die noch nicht zu einer signifikanten Steigerung der Mutationsrate führen, sterilisierend wirkt. Die Sterilität der Test-Fliegen nach Dimethyl-Myleran-Applikation war in den ersten beiden Serien ungefähr gleich, stieg dann nachhaltig an und erreichte in den Serien IV bzw. V bis X ihren Höhepunkt. In den

Tabelle 2. *Die Fertilität von Berlin wild-♂♂ nach Fütterung mit Dimethyl-Myleran und Myleran*

| Anzahl der | Serie | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X |
| a) 1%ige Suspension von Dimethyl-Myleran | | | | | | | | | | |
| $P_1$-♂♂ | 125 | 115 | 106 | 102 | 99 | 95 | 84 | 74 | 61 | 52 |
| F-♀♀ | 1390 | 1481 | 689 | 149 | 60 | 55 | 146 | 70 | 60 | 52 |
| b) 1%ige Suspension von Myleran | | | | | | | | | | |
| P-♂♂ | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | | | |
| $F_1$-♀♀ | 1263 | 1080 | 978 | 867 | | | | | | |

10-Serienversuchen mit Myleran (RÖHRBORN 1959) und in einem entsprechenden Kontrollversuch wurde die Fertilität der geprüften Männchen in den höheren Serien ebenfalls geringer, jedoch niemals so niedrig wie in den vorliegenden Dimethyl-Myleran-Experimenten.

Insgesamt 52 P-♂♂ lebten am Schluß (Serie X) der Versuche mit Dimethyl-Myleran noch. Von diesen 52 Männchen waren in Serie V bereits 46 völlig steril, ohne in den folgenden Serien ihre Fertilität wiederzuerlangen; 30 von ihnen hatten ihre Fruchtbarkeit sogar schon früher verloren. Auch diese Erscheinung konnte nach Myleran-Behandlung nicht beobachtet werden.

Auffällig ist, daß der höchste Grad der Sterilität nach Verfütterung von Dimethyl-Myleran in den Serien erreicht wurde, in denen die Mutationsraten am niedrigsten waren.

## Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Dimethyl-Myleran unter vergleichbaren Bedingungen etwa dreimal stärker mutagen wirkt als Myleran. Dies stimmt gut mit den in der Einleitung erwähnten Befunden von ELSON (1958) betreffs der relativ größeren cytostatischen Wirksamkeit von Dimethyl-Myleran überein. In ihren Experimenten über die Induktion sichtbarer Mutationen an ausgewählten Loci von *Drosophila* berichten ALTENBURG und ALTENBURG (1958) ebenfalls über eine Mutagenität dieser Verbindung.

Die 10-Serienversuche mit Dimethyl-Myleran lieferten das gleiche Brutmuster wie es von uns für Myleran gefunden wurde. Es zeigte sich, daß postmeiotische Stadien der Spermatogenese hinsichtlich ihrer Mutabilität auch gegenüber dem Dimethyl-Homologen des Myleran wesentlich empfindlicher sind als prämeiotische Stadien. Übereinstimmend zu den Myleran-Experimenten konnten nach Verfütterung von Dimethyl-Myleran ebenfalls keine signifikanten Sensibilitätsunterschiede zwischen Spermatiden und Spermatozoen festgestellt

werden. Bezüglich der Sterilisationswirkung zeigte sich Dimethyl-Myleran biologisch aktiver als vergleichbare Dosen von Myleran.

Die Höhepunkte von Mutagenität und Sterilität lagen bei den Dimethyl-Myleran-Versuchen in verschiedenen Serien. Die höchsten Mutationsraten traten in den Serien I—IV auf; in den darauffolgenden Serien V—X sanken sie bis zu Spontanwerten ab. Demgegenüber war die Fertilität in den Serien I—III nur mäßig herabgesetzt, in den Serien IV—X jedoch sehr stark erniedrigt. Dies weist darauf hin, daß der Anteil dominanter Letalmutationen an der Sterilität in unseren Versuchen nicht groß sein kann.

Für die stärkere biologische Wirksamkeit von Dimethyl-Myleran sind mehrere Deutungen möglich. So könnte die größere Wasserlöslichkeit und die damit verbundene bessere Resorbier- und Transportierbarkeit im Organismus dafür verantwortlich sein (vgl. Röhrborn 1959, Timmis und Hudson 1958). Auch die im Vergleich zu Myleran höhere Hydrolysegeschwindigkeit von Dimethyl-Myleran kommt als Ursache für dessen größere Reaktivität in Betracht (vgl. Hudson u. Mitarb., Talbot u. Elson 1958). Myleran und Dimethyl-Myleran sind beide alkylierende Agentien, folgen in der Alkylierungsreaktion jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit verschiedenen Mechanismen. Myleran unterliegt dem sog. $S_{N_2}$-Mechanismus und Dimethyl-Myleran dem $S_{N_1}$-Mechanismus (Ross, pers. Mitt., Timmis u. Hudson 1958). Die beiden Methylgruppen wurden dem Myleran in der Absicht hinzugefügt, den Alkylierungsmechanismus zu modifizieren). Somit wäre es möglich, daß die beobachteten Differenzen in der biologischen Wirkung auf diese Unterschiede im Reaktionsmechanismus zurückgehen.

## Zusammenfassung

Die orale Verabfolgung von Dimethyl-Myleran löste in den Männchen des Stammes „Berlin wild" von *Drosophila melanogaster* etwa 6% geschlechtsgebundene Letalmutationen aus. Die beobachteten Mutationen wurden hauptsächlich in postmeiotischen Keimzellstadien induziert. Die Fertilität der behandelten Tiere wurde erheblich gesenkt.

Dimethyl-Myleran wirkt unter vergleichbaren Bedingungen etwa dreimal stärker mutagen und deutlich stärker sterilisierend als Myleran. Die Sensibilität des Spermatogenesezyklus gegenüber der mutagenen Wirkung von Dimethyl-Myleran und Myleran ist gleich. Die vermutlichen Ursachen für die unterschiedliche biologische Wirksamkeit der beiden Verbindungen werden diskutiert.

## Literatur

Altenburg, L. S., and E. Altenburg: The induction of visible mutations at selected loci by alkylating agents. (Abstr.) Proc. 10th Intern. Congr. Genet. (Montreal) **2**, 6—7 (1958). Bierman, H. R., K. H. Kelly, A. G. Knudson jr., T. Maekawa and G. M. Timmis: The influence of 1,4-dimethylsulfonoxy-1,4-dimethylbutane (CB 2348, dimethyl Myleran) in neoplastic disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. **68** (3), 1211—1222 (1958). — Elson, L. A.: Hematological effects of the alkylating agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. **68** (3), 826—833 (1958). — Galton, D. A. G., M. Till and E. Wiltshaw: Busulfan (1,4-dimethanesulfonyloxybutane, Myleran): Summary of clinical results. Ann. N.Y. Acad. Sci. **68** (3), 967—973 (1958). — Hudson, R. F., G. M. Timmis and R. D. Marshall: A physico-chemical investigation into the biological action of Myleran and related sulphonic acid esters. Biochem. Pharmacol. **1**, 48—59 (1958). — Koller, P. C.: Comparative effects of alkylating agents on cellular morphology. Ann. N.Y

Acad. Sci. **68** (3), 783—801 (1958). — Lüers, H.: Untersuchungen über die Mutagenität des Triäthylenmelamin (TEM) an *Drosophila melanogaster*. Arch. Geschwulstforsch. **6**, 77—83 (1953). — Röhrborn, G.: Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 116—131 (1959). — Ross, W. C. J.: The chemistry of cytotoxic alkylating agents. Advanc. Cancer Res. **1**, 397—449 (1953). — In vitro reactions of biological alkylating agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (3), 669—981 (1958). — Stacey, K. A., M. Cobb, S. F. Cousens and P. Alexander: The reactions of the "radiomimetic" alkylating agents with macromolecules in vitro. Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (3), 682—701 (1958). — Stevens, W. L.: Accuracy of mutation rates. J. Genet. **43**, 301—307 (1942). — Talbot, T. R., and L. A. Elson: Protection of august rats against lethal doses of a dimethyl homologe of Myleran by isologous bone marrow. Nature (Lond.) **181**, 684—686 (1958). — Timmis, G. M., and R. F. Hudson: Discussion: Part I. Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (3), 727—730 (1958).

Dr. G. Röhrborn, Institut für Genetik der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Rudeloffweg 9

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 463—475 (1959)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

# VERGLEICH DER PROTEINE DES NORMALSTAMMS UND EINER NITRITMUTANTE DES TABAKMOSAIKVIRUS

Von

H. G. Wittmann

Mit 2 Textabbildungen

*(Eingegangen am 1. Dezember 1959)*

Schon seit einiger Zeit gibt es Hinweise dafür, daß das Material der Erbfaktoren Nukleinsäure ist. Das ist für die Desoxyribonukleinsäure (DNS) vor allem bei dem transformierenden Prinzip der Pneumokokken und bei Bakteriophagen, für die Ribonukleinsäure (RNS) bei phyto- bzw. tierpathogenen Viren gezeigt worden. Mundry und Gierer (1958), Vielmetter und Wieder (1959), Kaudewitz (1959) zeigten außerdem an verschiedenen Objekten, daß die Veränderung einer einzigen Base in der Nukleinsäure für das Zustandekommen einer Mutation ausreicht.

Soweit durch diese Erkenntnisse die Bedeutung der Proteine für die genetische Konstitution auch eingeschränkt sein mag, wissen wir doch andererseits aus den Tatsachen der biochemischen Genetik, daß die Wirkung der Gene über Fermente erfolgt, die hochgradige Eiweißspezifität zur Voraussetzung haben. Außerdem kennen wir die ebenfalls auf Proteinunterschiede beruhenden serologischen Spezifitäten bei verschiedenen Genotypen von Viren und Organismen. Eine der Grundfragen der an der Genetik orientierten Entwicklungsphysiologie ist also die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Änderungen in der Konstitution der Nukleinsäuren und der Proteine.

Das von der Gruppe um Ingram gefundene Ergebnis, daß der Unterschied zwischen dem Hämoglobin gesunder und sichelzellenkranker Neger — ein monohybrid mendelnder Unterschied — nur in dem Austausch einer Aminosäure gegen eine andere (Valin gegen Glutaminsäure) besteht, hat zu der Hypothese: 1 Genänderung = 1 Aminosäureaustausch geführt.

Da seit der Arbeit von Gierer und Mundry (1958) beim Tabakmosaikvirus (TMV) die Möglichkeit besteht, Mutationen mit salpetriger Säure zu erzeugen, und durch sehr kurze Behandlungszeit Mutanten erzeugt werden können, die sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nur in einer Base vom Ausgangsmaterial unterscheiden, durch lange (oder besser wiederholte) Behandlung solche, die sich in mehr als einer Base unterscheiden, liegt es nahe, das Tabakmosaikvirus für die obenerwähnte Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Konstitution der Nukleinsäure und der des Proteins heranzuziehen. Es bietet außerdem folgende Vorteile: 1. Seine Nukleinsäure besteht als RNS aus einem einzigen Strang aus etwa 6000 Nukleotiden. 2. Es enthält außer Protein und RNS keine anderen Komponenten. 3. Das Virusprotein läßt sich in genügender Menge und Reinheit für die in Frage stehende Analyse gewinnen. 4. Das Protein besteht aus etwa 2200 identischen Untereinheiten, die in Form einer Polypeptidkette vom Molekulargewicht 17000—18000

vorliegen. Damit reduziert sich das heute unlösbare Problem, Proteine vom Molekulargewicht $38 \times 10^6$ (das Gesamtmolekulargewicht des Virusproteins) analysieren zu müssen, auf den im Bereich des Möglichen liegenden Vergleich zwischen Proteinen vom Molekulargewicht 17000—18000. Allerdings ist für die einwandfreie Lösung einer derartigen Aufgabe, bei der mit Sicherheit Veränderungen einer einzigen von 157 Aminosäuren einer Polypeptidkette gefunden werden müssen, notwendig, die besten z. Z. verfügbaren Verfahren der Proteinchemie anzuwenden.

Im folgenden wird über die Durchführung von quantitativen Aminosäureanalysen zur Bestimmung der Zusammensetzung der Polypeptidketten sowie über die Spaltung der Polypeptidketten mit Trypsin, die Isolierung, Reinigung und Analyse aller tryptischen Peptide des Normalstamms und einer der mit Nitrit erzeugten Mutanten berichtet.

## Material und Methoden

### *1. Material*

Die Vermehrung der beiden Stämme *vulgare* (Melchers 1942) und der Nitritmutante *Ni 54* (Mundry und Gierer 1958) erfolgte auf *Nicotina tabacum* var. „Samsun" im Gewächshaus unter möglichst gleichen Bedingungen. Die Nitritmutante unterscheidet sich vom Normalstamm durch sehr stark abgeschwächte Symptome auf Samsuntabak. Auf Javatabak erzeugt *Ni 54* ebenfalls ein schwaches systemisches Symptom. Diese Mutante gehört also nicht zu den auf Javatabak primär nekrotischen Stämmen, die zur quantitativen Analyse der Mutationserzeugung benutzt wurden. Da die Mutante aus einem Versuch mit langer Inkubationszeit (96 min, s. Mundry und Gierer 1958, Tabelle 2) isoliert wurde, besteht durchaus eine Chance, daß sie in mehr als einem Nukleotid verändert ist. Mindestens ein Nukleotid der 6000 Nukleotide der Virus-RNS muß aber verändert sein.

Das Symptombild beider Stämme ist in Abb. 1 gegenübergestellt. Aus einer weiteren Behandlung von *Ni 54* mit Nitrit wurde *Ni 54/63* isoliert; es wurde ursprünglich angenommen, daß dieses Isolat noch stärker abgeschwächte Symptome als *Ni 54* aufweist. Doch stellte es sich in späteren, an mit einem großen Material von *Ni 54* und *Ni 54/63* ausgeführten Versuchen heraus, daß zwischen ihnen kein Unterschied in den Symptomen besteht. Die Aminosäurezusammensetzung ergab auch keine Unterschiede.

Zur Virusaufarbeitung wurden die Blätter der infizierten Pflanzen eingefroren, mazeriert, der Preßsaft mit $Na_2HPO_4$ auf $p_H$ 7 gebracht, zunächst bei $p_H$ 4.3 das Wirtsprotein, dann bei $p_H$ 3,4 das Virus durch isoelektrische Präzipitation gefällt. Die Isolierung des Virus erfolgte durch 5malige Wiederholung von nieder- bzw. hochtouriger Zentrifugierung und Einfrieren bei —18° C. Die ersten 4 Zyklen wurden in m/15 Phosphatpuffer $p_H$ 7, der letzte in dest. Wasser ausgeführt.

Zur Prüfung auf feststellbare Mengen von Wirtsprotein wurde Protein aus gesunden Tabakblättern nach der Methode von Wildman und Jagendorf (1952) hergestellt, damit sofort, ohne zwischendurch das Protein einzufrieren, Kaninchen injiziert und Wirtsprotein-Antiserum gewonnen. Serologisch ließ sich kein Wirtsprotein in den nach dem obigen Verfahren hergestellten Viruspräparaten nachweisen. Dies ist auch schon deswegen unwahrscheinlich, weil der größte Teil des Wirtsproteins nach Einfrieren bei —18° C und Auftauen irreversibel ausflockt. Ein weiterer und noch strengerer Beweis für die Reinheit der Viruspräparate ist darin zu sehen, daß in den quantitativen Aminosäureanalysen, die, wie später beschrieben, in dem automatischen Apparat nach Spackman, Stein und Moore durchgeführt wurden, in keiner der zahlreichen geprüften Virusaufarbeitungen die nur im Wirtsprotein, jedoch nicht im TMV vorkommenden Aminosäuren Histidin und Methionin gefunden wurden.

### *2. Methoden*

**a) Proteinspaltung.** Die Spaltung des Virus in Protein und RNS erfolgte im wesentlichen nach der Essigsäuremethode nach Fraenkel-Conrat (1957). Es konnte durch physikochemische Untersuchungen gezeigt werden, daß dabei eine Spaltung des Virusproteins in die

a b

Abb. 1a u. b. Vergleich der Symptome der beiden untersuchten Stämme des Tabakmosaikvirus (TMV). a Normalstamm des TMV *(vulgare)* mit den für diesen Stamm typischen Mosaikflecken und Blattdeformationen. b Aus dem Normalstamm durch Nitritbehandlung erzeugte Mutante *Ni 54* mit sehr stark abgeschwächten, kaum sichtbaren Symptomen. (Phot. Mundry, a = Abb. 7g, b – Abb. 6g in Mundry u. Gierer 1958)

Untereinheiten vom Molekulargewicht 17 000—18 000 erfolgt (Wittmann 1959). (Versuche mit Virusprotein, das nach der Phenolmethode gewonnen wurde, ergaben, daß trotz mannigfacher Variation des Verfahrens die tryptische Spaltung wesentlich schlechter erfolgte als mit dem nach der Essigsäuremethode erhaltenen Protein.)

1 Volumenteil auf 4° gekühlte Viruslösung (2—3%) wurde zu 2 Teilen unterkühltem (4°) Eisessig gegeben, mäßig geschüttelt, nach 30 min zentrifugiert, der Überstand 2 Tage gegen Wasser und 1 Tag gegen m/50 Acetatpuffer $p_H$ 4,7 dialysiert, in der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert, das Sediment in Wasser aufgenommen und in ein auf 37° gehaltenes Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zugabe von verdünnter NaOH bis $p_H$ 7,9 wurde die Proteinlösung völlig klar. Danach wurde Trypsin [Worthington Biochemical Corporation, Freehold N. J.; Lot No. 591; mit Trichloressigsäure gereinigt; 18 Std vor dem Beginn der Spaltung in n/16 HCl gelöst und bei 37° gehalten (Northtrop und Kunitz 1936)] in einer Menge von 1% des Proteins (400 mg) dazugegeben und der $p_H$-Wert durch einen Autotitrator auf $p_H$ 7,9, die Temperatur auf 37° gehalten. Der Verbrauch der Natronlaugemenge in Abhängigkeit von der Spaltungsdauer wurde durch ein Schreibgerät nach Jacobson und Leonis (1951) ermittelt.

Nach Versuchen unter Variierung der Spaltungsdauer und anschließender Trennung der tryptischen Peptide durch die weiter unten beschriebene Säule wurde in allen späteren Versuchen eine Spaltungszeit von 10 Std eingehalten. Dabei sind noch keine nennenswerten Spaltungen durch eventuell noch als Verunreinigung vorhandenes Chymotrypsin nachzuweisen, während die Spaltung der durch das Trypsin angreifbaren Peptidbindungen fast quantitativ abgeschlossen ist. Es konnte lediglich ein Doppelpeptid (Peptid-Nr. III + Nr. IX) neben beträchtlichen Mengen der Peptide III und IX isoliert werden. Bei Versuchen, in denen kurzzeitig mit Trypsin gespalten wurde und dann die tryptischen Peptide ohne vorherige Ausfällung des Peptids Nr. XII sofort auf die Säule gebracht wurden, zeigte es sich, daß bereits nach Spaltungszeiten von 45—60 min alle Peptide, wenn auch nicht in maximaler Ausbeute, erhalten werden konnten. Die Spaltung der meisten Peptidbindungen durch das Enzym erfolgt demnach sehr rasch; zu ähnlichem Schluß kommt man auf Grund der Alkaliverbrauchskurven, die mit dem erwähnten Schreibgerät nach Jacobson und Leonis erhalten wurden.

**b) Säulenchromatographische Auftrennung des Peptidgemisches.** Nach der tryptischen Spaltung wurde das Gemisch der Peptide mit HCl auf $p_H$ 4,7 titriert (Gish, Ramachandran und Stanley 1958), wobei neben kleinen Mengen anderer Peptide vor allem das größte Peptid (Nr. XII) ausfällt. Dieses wurde nach säulen- sowie papierchromatographischer Reinigung [35 Teile Pyridin + 35 Teile Isoamylalkohol + 30 Teile $NH_4OH$ (0,1 n)] und Oxydation mit Perameisensäure (Thompson 1954) auf die Aminosäurezusammensetzung hin analysiert.

Der die restlichen tryptischen Peptide enthaltende $p_H$ 4,7-Überstand wurde auf 8,9 gebracht und sofort auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1 x 2; 150 × 2 cm) gegeben (Rudloff und Braunitzer 1959; Wittmann und Braunitzer 1959). Die Säule war vorher 12—16 Std lang mit folgendem Puffer äquilibriert: 1% Pyridin + 1% 2,4,6-Collidin + 1,5 ml Eisessig pro 4 Liter. Der gleiche Puffer wurde zum Eluieren der ersten Peptide benutzt. Nach 65 Fraktionen wurde folgendes Gradientenverfahren angewendet: In ein Gefäß mit 1 Liter Puffer (1% Pyridin + 1% Collidin + 0,2% Eisessig), worin sich ein Magnetrührer befand, wurde in dem Maße, in dem Puffer zur Säule gepumpt wurde, 0,1 n Essigsäure nachgesaugt. Nach Fraktion Nr. 170 wurde die 0,1 n Essigsäure gegen 2 n und nach Fraktion Nr. 250 diese gegen Eisessig ausgetauscht.

Die Fraktionsgröße betrug durchgehend 10 ml, die Temperatur der Säule 35°, die Durchflußgeschwindigkeit 40 ml pro Stunde. Ein aliquoter Teil jeder Fraktion wurde mit 2,5 n NaOH inkubiert (2,5 Std; 90°) und nach Neutralisation mit 30%iger Essigsäure mit dem modifizierten Ninhydrinreagenz nach Moore und Stein (1954a) getestet.

**c) Reinigung und Analyse der Peptide.** Zur Isolierung der Peptide wurden die betreffenden Fraktionen vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum in einem Rotationsverdampfer entfernt und das Peptid in Pyridin + Wasser aufgenommen. Bei einzelnen Peptiden, die schlecht in Lösung gingen, wurde etwas $NH_4OH$ zugefügt. Eine Entsalzung der Peptide war in keinem Fall notwendig. Die Reinigung erfolgte durch Hochspannungselektrophorese (Pyridin-Acetat-Puffer, $p_H$ 6,4 bzw. 3,6) oder durch aufsteigende Chromatographie. Dabei erwies sich unter vielen geprüften Chromatographiesystemen ein Gemisch von 35 Volumenteilen Pyridin + 35 Teilen Isoamylalkohol + 30 Teilen Wasser (bei der Reinigung von manchen Peptiden statt des Wassers von 30 Teilen 0,1 n $NH_4OH$) als das am besten geeignete System. Die Identifizierung der Peptidflecken erfolgte durch die Chlormethode nach Rydon und Smith (1952) bzw. durch Besprühen mit Ninhydrin. Nach Elu-

ierung der Peptide und Entfernen des Elutionsmittels im Rotationsverdampfer wurde mit 6 n HCl unter Stickstoff in abgeschmolzener Ampulle bei 110° für Zeiten von 16—64 Std hydrolysiert. Quantitative Aminosäurebestimmung wurde in dem automatischen Aminosäureanalysator der Firma Beckman/Spinco Division nach Spackman, Stein und Moore (1958) durchgeführt. Bei Tryptophan, das fast vollständig bei der Hydrolyse zerstört wird, erfolgte der Vergleich zwischen den Stämmen durch Chromatographie der Peptide und Besprühen der Chromatogramme mit p-Dimethylaminobenzaldehyd sowie durch Absorptionsuntersuchung im UV-Bereich (Holiday 1936, Goodwin und Morton 1946). Ein eventueller Unterschied im Cysteingehalt wurde in einigen Fällen durch Perameisensäure-Oxydation (Thompson 1954) und Bestimmung der Cysteinsäuremenge im Hydrolysat geprüft.

Die Endgruppenbestimmungen wurden nach der DNP-Methode von Levy (1955) durch Umsatz der Peptide mit Fluordinitrobenzol ausgeführt.

## Ergebnisse

**a) Totalanalysen.** Die Ergebnisse der Protein-Totalanalysen des Normalstamms *vulgare* und der Nitritmutante *Ni 54* sind in der Tabelle zusammengestellt. Die Analysen wurden bei beiden Stämmen vom Virusprotein, das nach der Essigsäuremethode gewonnen wurde, durchgeführt. Der Vergleich der $2 \times 10$ Analysen läßt keinen Unterschied in der quantitativen Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Stämme erkennen.

Es ist bekanntlich nicht möglich, die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins durch Analyse des Aminosäuregemisches nach einer bestimmten Hydrolysezeit genau zu bestimmen, da ein Teil der Aminosäuren bereits zerstört wird, bevor alle Peptidbindungen gespalten sind. Es ist daher üblich, verschieden lange Hydrolysezeiten anzuwenden, um durch Extrapolation zu den Endwerten zu kommen.

Der Grad der Zerstörung bestimmter Aminosäuren ist nicht bei allen Proteinen gleich groß und hängt neben der Zusammensetzung des Eiweißes vor allem von eventuellen Verunreinigungen ab. So kommen verschiedene Autoren bei Untersuchungen an unterschiedlichen Proteinen zu zwar qualitativ im wesentlichen übereinstimmenden, doch quantitativ abweichenden Ergebnissen (z. B. Rees 1946, Harfenist 1953, Smith u. Stockell 1954, Hirs, Stein u. Moore 1954, Ramachandran 1958, Aach 1958). Übereinstimmend wird für die Hydroxyaminosäuren ein Abfall der Werte mit zunehmender Hydrolysezeit gefunden, und zwar bei Serin stärker als bei Threonin; außerdem ist bei Tyrosin ein deutlicher Abfall zu beobachten. Tryptophan wird so stark zerstört, daß gesonderte Bestimmungsmethoden nötig sind, die eine Hydrolyse ganz vermeiden, vor allem aber spektrophotometrische Untersuchungen im UV-Bereich. Die Werte für Valin, Leucin und besonders Isoleucin steigen mit zunehmender Hydrolysezeit an. Daß andere Aminosäuren (so z. B. Glutamin- und Asparaginsäure, Arginin, Prolin, Lysin) zerstört werden, ist nicht in allen Fällen gefunden worden, vgl. z. B. Smith, Stockell und Kimmel (1954) einerseits und Rees (1946) andererseits. Auf jeden Fall ist der Grad der Zerstörung bei weitem nicht so beträchtlich wie bei den Hydroxyaminosäuren. Hirs, Stein und Moore (1954b), die bei der Totalanalyse der Ribonuklease für eine eventuelle Zerstörung bestimmter Aminosäuren durch Extrapolation auf Hydrolysezeit null korrigierten, fanden später bei der Untersuchung der tryptischen Peptide (Hirs, Moore u. Stein 1956), daß die in der ersten Arbeit extrapolierten Werte für Asparaginsäure und Prolin zu hoch angenommen wurden.

Tabelle. *Vergleich der Aminosäurezusammensetzung des Normal-*
Die Ziffern geben die Zahl der betreffenden Aminosäuren

| | Normalstamm | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hydrolysezeit | 15 Std | 16 Std | 16 Std | 18 Std | 20 Std | 30 Std | 40 Std | 62 Std | 64 Std | 99 Std |
| Lys | 1,99 | 1,98 | 2,02 | 2,00 | 1,97 | 2,05 | 2,10 | 2,04 | 2,07 | 1,98 |
| Arg | 10,7 | 11,2 | 11,1 | 10,9 | 11,2 | 10,8 | 11,4 | 10,6 | 10,8 | 10,2 |
| Asp | 17,9 | 17,8 | 17,2 | 18,0 | 18,2 | 17,6 | 17,3 | 17,8 | 18,1 | 17,6 |
| Thr | 14,6 | 15,0 | 14,7 | 15,2 | 15,4 | 15,0 | 14,5 | 13,8 | 13,7 | 13,0 |
| Ser | 14,9 | 14,9 | 14,3 | 14,6 | 14,9 | 14,8 | 13,6 | 12,6 | 12,1 | 10,5 |
| Glu | 15,6 | 15,5 | 15,4 | 15,6 | 15,8 | 15,4 | 15,5 | 15,2 | 15,0 | 15,4 |
| Pro | 8,08 | 8,27 | 8,58 | 7,87 | 7,91 | 7,97 | 7,97 | 8,06 | 7,59 | 7,92 |
| Gly | 5,99 | 5,98 | 5,89 | 5,90 | 5,88 | 5,87 | 5,98 | 5,90 | 6,19 | 6,07 |
| Ala | 14,0 | 14,0 | 13,9 | 14,2 | 13,9 | 14,2 | 14,0 | 14,1 | 13,9 | 13,9 |
| Val | 12,9 | 13,4 | 13,4 | 13,4 | 13,4 | 13,9 | 14,1 | 14,5 | 14,2 | 14,3 |
| Ileu | 7,64 | 7,63 | 8,05 | 7,46 | 7,57 | 8,24 | 8,70 | 8,76 | 8,79 | 8,23 |
| Leu | 12,1 | 11,6 | 12,3 | 11,7 | 12,1 | 12,1 | 12,0 | 11,8 | 11,8 | 12,3 |
| Tyr | 4,00 | 3,96 | 4,18 | 3,60 | 3,71 | 3,96 | 3,75 | 3,32 | 3,33 | 3,14 |
| Phe | 7,98 | 8,04 | 8,38 | 7,81 | 8,19 | 8,06 | 8,02 | 7,96 | 7,89 | 7,98 |
| Cys | | | | | 0,85 | | 0,79 | | | |

Bei der Berechnung der in der Tabelle angeführten Werte handelt es sich bei jeder Ziffer um die Zahl der Reste, die von der betreffenden Aminosäure in einer Polypeptidkette des TMV enthalten sind. Die Polypeptidkette setzt sich aus 157 Aminosäuren zusammen (Wittmann u. Braunitzer 1959). Die Berechnung der Reste in der Tabelle ist auf das Vorkommen von 6 Glycinen, 8 Phenylalaninen und 14 Alaninen pro Polypeptidkette bezogen; diese Zahlen sind der weiter unten erläuterten Analyse der einzelnen tryptischen Peptide entnommen.

Die Werte für Cystein wurden wegen der dafür notwendigen Oxydation mit Perameisensäure nur in einigen Fällen bestimmt. Da jedoch nur 1 Cystein pro Polypeptidkette vorliegt, wäre ein Unterschied um 1 Cysteinrest auch bei nur sehr wenigen Analysen zu erkennen.

**b) Peptidanalysen.** Es stand bei den vorliegenden Untersuchungen zur Diskussion, ob überhaupt ein Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung der Proteine beider Virusstämme besteht oder nicht. Dabei kann dieser Unterschied im ungünstigen Fall lediglich in dem Austausch, Fehlen oder Dazukommen einer einzigen Aminosäure pro Polypeptidkette vom Molekulargewicht 17000—18000 bestehen. Um solch einen minutiösen Unterschied in der Zusammensetzung der Proteine mit Sicherheit zu entdecken oder auszuschließen, wurde eine Analyse der tryptischen Peptide durchgeführt. Über Einzelheiten der Virusspaltung in Protein und RNS, der Proteinspaltung mit Trypsin, der säulenchromatographischen Auftrennung des Peptidgemisches, der hochspannungselektrophoretischen bzw. papierchromatographischen Reinigung der Peptide sowie über die Hydrolyse nach der Eluierung der Peptide vom Papier und über die quantitative

*stamms und einer Nitritmutante des Tabakmosaikvirus*
pro Polypeptidkette des TMV an (Molekulargewicht: 17378).

| | Nitritmutante | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 Std | 16 Std | 20 Std | 20 Std | 20 Std | 38 Std | 40 Std | 64 Std | 83 Std | 84 Std |
| 1,99 | 2,00 | 2,15 | 2,20 | 2,07 | 2,14 | 2,12 | 2,16 | 2,25 | 1,85 |
| 10,6 | 10,6 | 11,1 | 11,3 | 11,1 | 11,4 | 11,5 | 11,1 | 10,7 | 10,9 |
| 17,6 | 17,8 | 17,5 | 17,7 | 17,6 | 17,9 | 18,0 | 18,1 | 17,6 | 17,2 |
| 15,1 | 15,2 | 15,1 | 15,3 | 14,8 | 14,6 | 14,8 | 14,7 | 13,4 | 12,4 |
| 15,2 | 15,3 | 14,4 | 14,5 | 14,2 | 14,0 | 13,2 | 12,4 | 11,5 | 12,1 |
| 15,5 | 15,8 | 15,6 | 15,8 | 15,1 | 15,9 | 15,8 | 15,5 | 15,8 | 15,4 |
| 8,13 | 8,25 | 7,85 | 8,03 | 8,04 | 8,13 | 7,63 | 8,49 | 7,84 | 7,77 |
| 5,97 | 6,05 | 6,03 | 6,08 | 5,94 | 5,94 | 5,88 | 5,83 | 6,11 | 6,09 |
| 14,1 | 13,9 | 14,0 | 14,0 | 14,0 | 14,0 | 14,0 | 14,2 | 13,8 | 13,9 |
| 13,1 | 13,2 | 13,5 | 14,1 | 13,7 | 13,6 | 13,6 | 14,3 | 13,8 | 13,9 |
| 7,54 | 7,63 | 7,98 | 8,14 | 8,11 | 8,41 | 8,68 | 8,85 | 9,07 | 8,73 |
| 11,4 | 11,7 | 12,0 | 12,2 | 12,2 | 11,6 | 11,9 | 12,0 | 12,6 | 11,8 |
| 3,96 | 3,78 | 3,96 | 3,88 | 4,03 | 3,93 | 3,57 | 2,96 | 3,09 | 3,34 |
| 7,90 | 8,08 | 8,01 | 7,96 | 8,12 | 8,06 | 8,08 | 7,96 | 8,14 | 7,97 |
| | | | 0,76 | | | 0,83 | | | |

Aminosäurebestimmung wurde im methodischen Teil berichtet. Abb. 2 gibt das Diagramm eines typischen Laufs wieder, wobei die Ninhydrinextinktion der einzelnen Fraktionen dargestellt ist. Ein aliquoter Teil jeder Fraktion wurde mit

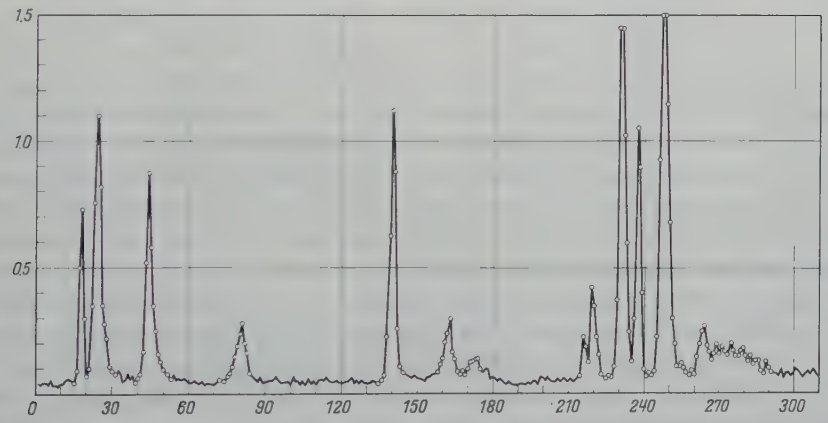



Abb. 2. Diagramm der säulenchromatographischen Auftrennung der tryptischen Peptide des Tabakmosaikvirus auf dem Anionenaustauscher Dowex 1 x 2 ($CH_3COO^-$ Zyklus). Ordinate: Ninhydrinextinktion nach alkalischer Spaltung; Abszisse: Zahl der Fraktionen (je 10 ml)

NaOH inkubiert; dabei werden die Peptide zu den Aminosäuren gespalten. Nach Neutralisierung mit Essigsäure wird eine bestimmte Menge an Ninhydrinreagenz zugesetzt und die Extinktion nach Inkubation bei 100° gemessen. — Die Abweichung in den Diagrammen, die bei Analyse der beiden Stämme

erhalten wurde, war nicht größer als die zwischen den Wiederholungen der Läufe bei einem Stamm. Vor allem wurde unter gleichen Bedingungen nie eine Veränderung in der Zahl der auftretenden Gipfel bemerkt.

Die Analyse der isolierten und gereinigten Peptide des Normalstamms führte zu folgenden Ergebnissen:

Peptid Nr. I: Thr, Glu, $Val_2$, Arg . . . . . = 5 Aminosäuren
Peptid Nr. II: Asp, Arg . . . . . = 2 Aminosäuren
Peptid Nr. III: Thr, $Ser_2$, $Glu_3$, $Pro_2$, $Val_3$, Phe, Try, Lys, Arg . . . = 15 Aminosäuren
Peptid Nr. IV: Asp, Thr, Ser, $Gly_2$, Tyr, Arg . . . . . = 7 Aminosäuren
Peptid Nr. V: Val, Tyr, Arg . . . . . = 3 Aminosäuren
Peptid Nr. VI: $Asp_2$, Thr, $Ala_2$, $Val_2$, Ileu, $Arg_2$ . . . . . = 10 Aminosäuren
Peptid Nr. VII: $Asp_3$, $Thr_4$, $Glu_4$, Pro, $Ala_3$, Val, Ileu, Leu, Arg . . . = 19 Aminosäuren
Peptid Nr. VIII: $Asp_3$, $Thr_2$, Pro, Gly, $Ala_3$, $Val_2$, $Leu_4$, Tyr, Phe, Arg = 19 Aminosäuren
Peptid Nr. IX: $Asp_2$, Ser, Pro, $Phe_2$, Lys . . . . . = 7 Aminosäuren
Peptid Nr. X: $Thr_2$. $Ser_6$, Glu, Pro, $Gly_2$, Ala, Val, Leu, Phe, Try. . = 17 Aminosäuren
Peptid Nr. XI: $Asp_2$, Ser, Glu, Ala, Val, $Ileu_3$, $Leu_3$, Arg . . . . . = 12 Aminosäuren
Peptid Nr. XII: $Asp_4$, $Thr_4$, $Ser_5$, $Glu_6$, $Pro_2$, Gly, $Ala_4$, Val, $Ileu_3$, $Leu_4$ Tyr, $Phe_3$, Cys, Try, Arg = 41 Aminosäuren

Daraus ergibt sich als Summe aller Aminosäuren: $Asp_{18}$, $Thr_{16}$, $Ser_1$, $Glu_{16}$, $Pro_8$, $Gly_6$, $Ala_{14}$, $Val_{14}$, $Ileu_8$, $Leu_{12}$, $Tyr_4$, $Phe_8$, Cys, $Try_3$, $Lys_2$, $Arg_{11}$, insgesamt 157 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17378. Das Molekulargewicht ist unter der Annahme berechnet, daß insgesamt 20 Glutamin- bzw. Asparaginsäuren amidiert sind.

Die N-terminalen Endgruppen der einzelnen Peptide wurden mit der DNP-Methode nach Levy (1955) wie folgt bestimmt:

| | |
|---|---|
| Peptid I: Thr | Peptid VII: Ileu |
| Peptid II: Asp | Peptid VIII: Tyr |
| Peptid III: Glu | Peptid IX: Phe |
| Peptid IV: Gly | Peptid X: Ser |
| Peptid V: Val | Peptid XI: nicht bestimmt |
| Peptid VI: Arg | Peptid XII: keine |

Das N-terminale Ende der Polypeptidkette hat keine freie Endgruppe, sondern ist acetyliert. Nach chymotryptischer Spaltung konnte N-Acetylseryltyrosin nachgewiesen werden (Narita 1958, Anderer 1959). Das gleiche Peptid konnte ich durch chymotryptische Spaltung des Peptids Nr. XII und Säulenchromatographie isolieren. Damit dürfte bewiesen sein, daß die Polypeptidkette mit Peptid Nr. XII beginnt. Der Normalstamm und *Ni 54* zeigten in dieser Beziehung keinen Unterschied.

Die $R_f$-Werte der Peptide gleicher Nummer in den papierchromatographischen Analysen sind bei *vulgare* und *Ni 54* identisch. Läßt dieser Befund zusammen mit der Tatsache, daß die Peptide bei der säulenchromatographischen Trennung in den Fraktionen gleicher Nummer erscheinen, bereits eine weitgehende Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Peptide vermuten, so wird die Identität der Peptide in bezug auf ihre Aminosäurezusammensetzung durch die durchgeführte quantitative Aminosäureanalyse erwiesen. Als Endergebnis ergibt sich daraus, daß zwischen den untersuchten Peptiden der beiden Stämme kein Unterschied in bezug auf die Aminosäurezusammensetzung vorhanden ist. Allerdings bedarf dabei das Peptid Nr. XI noch weiterer Untersuchung, da es bisher nur bei *vulgare* und in schlechter Ausbeute gewonnen werden konnte. Für

die angegebene Zusammensetzung von Peptid Nr. XI spricht sehr stark die Tatsache, daß nach Abzug der in den übrigen Peptiden enthaltenen Aminosäuren von der in der Tabelle angegebenen Zahl an Aminosäuren eine Aminosäurezusammensetzung sich ergibt, die der des Peptids Nr. XI entspricht, und das gilt nicht nur für *vulgare*, sondern auch für *Ni 54*.

Bisher ist nicht mit völliger Sicherheit bewiesen, daß alle Untereinheiten des TMV in ihrer Zusammensetzung und Struktur identisch sind. Solange die Möglichkeit einer Heterogenität der Peptidketten nicht ausgeschlossen ist, wäre es voreilig, auf eine absolute Identität der Untereinheiten zu schließen. Es sprechen allerdings sehr wichtige Gründe dafür, daß die Ketten gleich sind, so die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse, denen zufolge keine Unterschiede zwischen den Untereinheiten bestehen; ferner die Befunde, daß bei den Endgruppenbestimmungen am C- bzw. N-terminalen Ende der Polypeptidketten außer den charakteristischen Aminosäuren keine nachweisbaren Mengen anderer Aminosäuren vorhanden sind. Doch ist mit der Tatsache, daß Anfang und Ende aller Polypeptidketten identisch sind, nicht bewiesen, daß dies auch zwangsläufig in der gesamten Kette der Fall ist. Es könnte sein, daß an bestimmten Stellen der Kette eine andere Zusammensetzung oder Reihenfolge der Aminosäuren vorliegt.

Dies wird jedoch bereits durch die quantitativen Aminosäurebestimmungen unwahrscheinlich gemacht, wonach unter Berücksichtigung der bei der Hydrolyse ablaufenden Prozesse recht befriedigend ganzzahlige Verhältnisse für die Zahl der Aminosäuren pro Peptidkette gefunden wurden. Eine noch weit stärkere Stütze erhält die Annahme von der Identität der Polypeptidketten durch die Analyse der tryptischen Peptide. Wäre mehr als eine Art von Polypeptidketten vorhanden, so müßten auch mehr tryptische Peptide, die in ihrer Zusammensetzung nicht übereinstimmen, auftreten als nach der Menge an Arginin bzw. Lysin zu erwarten wäre. Die Totalanalyse ergibt 11 Arginin + 2 Lysin, insgesamt sollten also 14 Peptide auftreten. Ihre Zahl vermindert sich auf 12, weil Peptid Nr. III Arginin und Lysin, Peptid Nr. VI 2 Arginine (N- und C-terminal) enthält.

Um außer den genannten Gründen noch eine weitere Möglichkeit zur Klärung der Frage, ob alle Peptidketten gleich sind, zu prüfen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Bei der Behandlung des Virus nach dem im methodischen Teil beschriebenen Essigsäureverfahren erhält man nach der Zentrifugation einen Überstand, der Polypeptidketten gelöst enthält, während das Sediment aus Nucleinsäure + Protein besteht. Es wäre denkbar, daß die Zusammensetzung dieses Proteins eine andere ist als die der in der Essigsäure gelösten Polypeptidketten. Das Sediment wurde daher nach gründlichem Waschen mit wassergesättigtem Phenol behandelt und zentrifugiert, wonach die Nucleinsäure sich in der Wasserphase, das Protein in der Phenolphase befindet. Das Protein wurde mit Methanol (unter Zusatz von etwas Natriumacetat) gefällt, mit Methanol gewaschen, das restliche Phenol mit Äther entfernt, das getrocknete Protein hydrolysiert und anschließend mit dem beschriebenen automatischen Aminosäureanalysator analysiert. Es konnte keine Differenz gegenüber der Zusammensetzung, wie sie in der Tabelle angegeben ist, nachgewiesen werden. Dies ist als ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese von der Identität der Untereinheiten anzusehen; doch ist zu bedenken, daß trotz aller angeführten Befunde bisher noch kein *völlig*

*strenger* Beweis vorliegt, wonach *alle* im TMV vorkommenden Untereinheiten in bezug auf Zusammensetzung und Sequenz völlig identisch sind.

## Diskussion

Über Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung des Proteins verschiedener TMV-Stämme ist bereits von Knight (1947), Black und Knight (1953), Fraenkel-Conrat und Singer (1957) sowie von Schramm (1948) und Aach (1958) berichtet worden. Nicht in allen Fällen ist eine quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren, sondern nur die Verteilung des Stickstoffs in Gruppen von Aminosäuren erfolgt (Schramm 1948).

Mit einer Ausnahme dienten intakte Virusteilchen ohne Abspaltung der RNS als Ausgangsmaterial für die Hydrolyse. Wie bereits im experimentellen Teil dargestellt, laufen bereits bei der Hydrolyse eines reinen Proteins Vorgänge ab, die zu mehr oder weniger starker Zerstörung bestimmter Aminosäuren führen. Die dadurch bedingte Unsicherheit in der Bestimmung der Aminosäuren wird durch die Anwesenheit der RNS noch beträchtlich erhöht. Dies gilt besonders für die Beimengung durch die Kohlenhydratkomponente der RNS; doch ist außerdem auch die Bildung von Glycin aus Adenin erwiesen. Aach (1958) verwendete als Ausgangsmaterial für seine Hydrolysen reines Virusprotein. Ihm kam es in erster Linie auf den Vergleich einer größeren Anzahl von Stämmen an, und er benutzte zur Auftrennung und quantitativen Bestimmung der Aminosäuren die von Levy (1954) ausgearbeitete DNP-Methode. Diese ist der säulenchromatographischen Methode zur Bestimmung von Aminosäuren nach Moore und Stein (1954) in der Genauigkeit der Ergebnisse zweifelsfrei unterlegen.

Die einzige Arbeit (Ramachandran 1958), die bisher mit RNS-freiem Virusprotein und der säulenchromatographischen Methode nach Moore u. Stein durchgeführt wurde, beschränkt sich auf die Analyse des Normalstammes von Berkeley. Selbst zu dieser, m. E. bisher genauesten Analyse des TMV-Proteins ergeben sich beträchtliche Unterschiede: Ramachandran kommt auf Grund seiner Ergebnisse zu dem Schluß, eine Polypeptidkette des TMV bestehe aus 164 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18270, gegenüber 157 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17378 in dieser Arbeit. [Inzwischen wurde der in seiner Veröffentlichung angegebene Gehalt an 2 Tryptophanresten auf 3 erhöht (Gish 1959).]

In der vorliegenden Arbeit ist zum ersten Male ein RNS-freies TMV-Protein mit dem automatischen Aminosäureanalysator nach Spackman, Stein u. Moore (1958) untersucht worden. Dabei fallen viele Fehlerquellen fort, wie sie bei der von Ramachandran benutzten Handmethode infolge der zahlreichen Einzelschritte unvermeidlich sind; daraus erklärt sich auch m. E. zum großen Teil die Differenz zwischen beiden Ergebnissen. Es kann aber derzeit noch nicht ausgeschlossen werden, daß der in Berkeley vermehrte Normalstamm und unser *vulgare* kleine Unterschiede aufweisen.

Um die nach der Totalanalyse gewonnenen und in der Tabelle angeführten Resultate in der Analyse des Proteins der beiden untersuchten Virusstämme zu stützen, wurden von beiden Stämmen die tryptischen Peptide isoliert und analysiert. Soweit von Ramachandran und Gish (1959), Ramachandran und

Witkop (1959), Gish (1959) im Zusammenhang mit der Sequenzanalyse Zusammensetzungen einzelner Peptide veröffentlicht sind, stehen sie in guter Übereinstimmung mit den oben angegebenen Peptidzusammensetzungen. Bei Peptid Nr. IX wird allerdings von Ramachandran und Gish (1959) angegeben, daß dieses Peptid nur 1 Asparaginsäure enthält, während nach unseren Ergebnissen 2 Asparaginsäuren vorhanden sind. Beträchtliche Differenzen ergeben sich nur in der Zusammensetzung des Peptids Nr. XII, was sicherlich auf die noch nicht endgültige Analyse dieses Peptids durch die Gruppe in Berkeley zurückzuführen ist. Während Ramachandran u. Witkop (1959) als vorläufige Angabe folgende Zusammensetzung des Peptids Nr. XII annehmen: $Asp_4$, $Thr_4$, $Ser_6$, $Glu_5$, $Pro_2$, Gly, $Ala_4$, Val, $Ileu_3$, $Leu_5$, Tyr, $Phe_2$, Cys, Try, Arg, besteht das Peptid nach unseren Ergebnissen aus: $Asp_4$, $Thr_4$, $Ser_5$, $Glu_6$, $Pro_2$, Gly, $Ala_4$, Val, $Ileu_3$, $Leu_4$, Tyr, $Phe_3$, Cys, Try, Arg.

In den meisten Fällen sind die Untersuchungen an TMV-Stämmen ausgeführt worden, über deren Verwandtschaft zum Normalstamm nichts gesagt werden kann. Es sind Stämme darunter, wie der Stamm *Holmes' rib-grass* der Berkeley-Gruppe bzw. unser *dahlemense*-Stamm, die sich serologisch sehr beträchtlich von dem Normalstamm unterscheiden. Bei allen untersuchten Stämmen sind Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung angegeben bis auf einen von Knight (1947) angeführten Fall, wonach sich zwischen dem Normalstamm und dem „masked strain" kein Unterschied in der gesamtanalytischen Zusammensetzung, die mit mikrobiologischen Methoden geprüft wurde, und bei dem Vergleich nach dem „finger-print-Verfahren" (1957) ergab. Obwohl durch beide Methoden kein eindeutiger Beweis für die völlige Übereinstimmung beider Virusproteine gegeben ist, ist zu bemerken, daß auch der hier untersuchte Stamm, bei dem kein Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung vorhanden ist, ein Stamm mit sehr stark abgeschwächten Symptomen ist.

Bisher wurde noch nicht überprüft, ob ein Unterschied zwischen dem Normalstamm und *Ni 54* im Amidierungsgrad vorhanden ist. Untersuchungen über den Gesamtgehalt an Amidgruppen und die Menge an Asparagin bzw. Glutamin sind im Gange. Ferner ist es möglich, daß bei völliger Übereinstimmung der Polypeptidketten im Gehalt an Aminosäuren und Amiden lediglich Sequenzänderungen durch Vertauschen der Aminosäuren vorhanden sind. Allerdings müßten diese Sequenzänderungen sich in ihrem Bereich auf die Länge der tryptischen Peptide beschränken, da sonst Unterschiede in der Zusammensetzung bestimmter Peptide gefunden worden wären. Diese Möglichkeit läßt sich nur nach einer vollständigen Sequenzanalyse beider Stämme prüfen.

Die drastischen Differenzen in den Symptomen, die durch die beiden Virusstämme hervorgerufen werden, zeigen, daß die als Folge der Nitritbehandlung aufgetretene Änderung in der RNS-Struktur, die in der Veränderung mindestens einer Base besteht, eine starke Umstellung des Stoffwechsels der Wirtspflanze zur Folge hat. *Nach den hier vorgelegten Befunden muß sehr stark damit gerechnet werden, daß das Hüllenprotein der Virusteilchen bei der Mutante Ni 54 keinen Unterschied gegenüber dem des Ausgangsstamms aufweist.*

Fräulein Ingrid Hindennach und Fräulein Brigitte Ostertag danke ich für die Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

**Summary**

Mundry and Gierer (1958) reported on the possibility of producing mutants of tobacco mosaic virus (TMV) by treating the virus or its isolated ribonucleic acid (RNA) with nitrous acid. One of those mutants *(Ni 54)* produced by long treatment with nitrous acid (there is therefore a possibility that the RNA was changed by more than one hit) showed very mild symptoms on Samsun tobacco in great contrast to the behavior of ordinary TMV (Fig. 1).

The wild type of TMV *(vulgare)* and *Ni 54* were highly purified after multiplication, tested serologically for the absence of contamination by host protein and split into protein and RNA by the acetic acid procedure. Their amino acid composition was determined with an automatic amino acid analyzer according to the method of Moore and Stein. The results are compared in the table; the figures are the numbers of amino acid residues in the polypeptide chain of TMV (molecular weight: 17378). There are no differences in the composition of the proteins of the two strains.

In order to support the results for this important conclusion the tryptic peptides of the two strains were compared. After splitting of the virus into protein and RNA the subunits of the protein given by the acetic acid method were digested with trypsin and the tryptic peptides isolated by column chromatography (Fig. 2 shows an elution curve of a typical run; the ninhydrin color value is plotted against fraction number). The peptides were purified by high voltage electrophoresis or paper chromatography, eluted, hydrolyzed with 6 N HCl and their amino acid composition determined quantitatively in the analyzer described above. The composition of the 12 tryptic peptides and their N-terminal amino acids are given on page 470. The possibility that the polypeptide chains of TMV need not be identical is tested and discussed.

Comparison of the peptides of the two strains supported the conclusion based on the results of the table; there is no difference in the amino acid composition of the two strains. The only possible differences could be in the degree of amidation (which is at present being tested) or in the amino acid sequence resulting from the change of two amino acids. But if the latter is the case the change must be located within a given tryptic peptide, otherwise differences between certain peptides of the two strains must have been found.

*In spite of the fact that the change in the virus-RNA produced by the mutation process results in very striking differences in symptoms, there exists a very high probability that the protein composition of the normal TMV-strain and this particular mutant produced by nitrous acid is the same.*

**Literatur**

Aach, H. G.: Quantitative Aminosäurenanalysen an Mutanten des Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **13** b, 425 (1958). — Anderer, A.: Zur N-terminalen Konfiguration der Peptiduntereinheit im Protein des Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **14** b, 363 (1959). — Black, F. L., and C. A. Knight: A comparison of some mutants of tobacco mosaic virus. J. biol. Chem. **202**, 51 (1953). — Fraenkel-Conrat, H.: Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. Virology **4**, 1 (1957). — Fraenkel-Conrat, H., and B. Singer: Virus reconstitution. II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. Biochim. biophys. Acta **24**, 540 (1957). — Gierer, A., and K. W. Mundry: Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid in vitro. Nature (Lond.) **182**, 1457 (1958). — Gish, D. T.: The amino acid sequence of a pentadecapeptide obtained from a tryptic digest of the protein of tobacco mosaic virus. Biochim. biophys. Acta **35**, 557 (1959 b).

Gish, D. T., L. K. Ramachandran and W. M. Stanley: Studies on the amino acid sequence of tobacco mosaic virus (TMV) protein. I. Fractionation of products of tryptic hydrolysis by countercurrent distribution. Arch. Biochem. **78**, 433 (1958). — Goodwin, T. W., and R. A. Morton: The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. Biochem. J. **40**, 628 (1946). — Harfenist, E. J.: The amino acid composition of insulins isolated from beef, pork and sheep glands. J. Amer. chem. Soc. **75**, 5528 (1953). — Hirs, C. H. W., S. Moore and W. H. Stein: Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. J. biol. Chem. **219**, 623 (1956). — Hirs, C. H. W., W. H. Stein and S. Moore: The amino acid composition of ribonuclease. J. biol. Chem. **211**, 941 (1954). — Holiday, E. R.: Spectrophotometry of proteins. I. Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. II. Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins. Biochem. J. **30**, 1795 (1936). — Jacobson, C. F., and J. Leonis: A recording autotitrator. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **27**, 333 (1951). — Kaudewitz, F.: Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *Escherichia coli*. Z. Naturforsch. **14b**, 528 (1959). — Knight, C. A.: The nature of some of the chemical differences among strains of tobacco mosaic virus. J. biol. Chem. **171**, 297 (1947). — Some recent developments in the chemistry of virus mutants. In: The nature of viruses, p. 69. Ciba Foundation Symposium. London: Churchill 1957. — Levy, A. L.: A paper chromatographic method for the quantitative estimation of amino acids. Nature (Lond.) **174**, 126 (1954). — The fluordinitrobenzone method for endgroup analysis: In: Methods of biochemical analysis, vol. II. New York 1955. — Melchers, G.: Über einige Mutationen des Tabakmosaikvirus und eine „Parallelmutation" des Tomatenmosaikvirus Naturwiss. **30**, 48 (1942). — Moore, S., and W. H. Stein: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. biol Chem. **211**, 907 (1954a). — Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent crosslinked sulfonated polystyrene resins. J. biol. Chem. **211**, 892 (1954b). — Mundry, K. W., and A. Gierer: Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nucleinsäure in vitro. Z. Vererb.-Lehre **89**, 614 (1958). — Narita, K.: Isolation of acetylpeptide from enzymatic digest of TMV-protein. Biochim. biophys. acta **28**, 184 (1958). — Northrop, J. H., u. M. Kunitz: Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 2, S. 2213. Berlin 1936. — Ramachandran, L. K.: The amino acid composition of tobacco mosaic virus protein. Virology **5**, 244 (1958). — Ramachandran, L. K., and D. T. Gish: Studies on the amino acid sequence of tobacco mosaic virus (TMV) protein. II. The amino acid sequence of six peptides obtained from a tryptic digest. J. Amer. chem. Soc. **81**, 884 (1959). — Ramachandran, L. K., and B. Witkop: Selective cleavage of C-tryptophyl peptide bonds in proteins and peptides. J. Amer. chem. Soc. **81**, 4028 (1959). — Rees, M. W.: The estimation of threonine and serine in proteins. Biochem. J. **40**, 632 (1946). — Rudloff, V., u. G. Braunitzer: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **316** (1959) (im Druck). — Rydon, H. N., and P. W. G. Smith: A new method for the detection of peptides and similar compounds in paper chromatograms. Nature (Lond.) **169**, 922 (1952). — Schramm, G.: Zur Chemie des Mutationsvorganges beim Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **3b**, 320 (1948). — Smith, E. L., and A. Stockell: Amino acid composition of crystalline carboxypeptidase. J. biol. Chem. **207**, 501 (1954). — Smith, E. L., A. Stockell and J. R. Kimmel: Crystalline papain. III. Amino acid composition. J. biol. Chem. **207**, 551 (1954). — Spackman, B. H., W. H. Stein and S. Moore: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analyt. Chem. **30**, 1190 (1958). — Tabone, J., D. Robert and J. Troestler (1948): Zit. bei R. J. Block, E. L. Durrum and G. Zweig, A manual of paper chromatography and paper electrophoresis, p. 137. New York: Academic Press 1958. — Thompson, E. O. P.: Modification of tyrosine during performic acid oxidation. Biochim. biophys. Acta **15**, 440 (1954). — Vielmetter, W., u. C. M. Wieder: Mutagene und inaktivierende Wirkung salpetriger Säure auf freie Partikel des Phagen T 2. Z. Naturforsch. **14b**, 312 (1959). — Wildman, S., and A. T. Jagendorf: Leaf proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 131 (1952). — Wittmann, H. G.: Darstellung und physikochemische Charakterisierung der Peptidketten des Tabakmosaikvirus. Experientia (Basel) **15**, 174 (1959). — Wittmann, H. G., and G. Braunitzer: Isolation and composition of all tryptic peptides of tobacco mosaic virus. Virology **9**, 726 (1959).

Dr. H. G. Wittmann, Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, Tübingen, Corrensstr. 41

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 476—482 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

# ÜBER DAS VERHALTEN ZWEIER ZWERGFORMMUTANTEN VON *ANTIRRHINUM MAJUS* L. BEI PFROPFUNG UND BEHANDLUNG MIT GIBBERELLINSÄURE

Von

Rainer Bergfeld

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 4. Dezember 1959)*

## Einleitung

Bei Mutationsversuchen mit *Antirrhinum majus* (Oehlkers 1956, Bergfeld 1957) traten unter anderem 2 Zwergwuchsmutanten auf, die untereinander erhebliche Unterschiede aufwiesen. Nun zeigten zahlreiche Versuche der letzten Jahre, daß Gibberellinsäure nicht nur eine starke Sproßförderung der behandelten Pflanze zur Folge hat (u. a. Bukovac und Wittwer 1946, Rappaport 1957, Haesloop und Greulach 1957), sondern daß bei entsprechender Gibberellinapplikation einzelne genetisch bedingte Zwergformen einen normalen Wuchs erreichen können (Brian und Hemming 1955, Phinney 1956). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der geänderte Wuchs bei den beiden *Antirrhinum*-Mutanten auf gleiche Störungen im Entwicklungsprozeß zurückzuführen sind, wobei diese einmal schwächer und einmal stärker wirksam werden, oder ob jeweils vollkommen andere Glieder, die die Entwicklung der Pflanze steuern, betroffen wurden.

## Material und Methode

Die zu den Versuchen verwendeten Zwergformmutanten waren die Mutante *densa* (vgl. Schick und Stubbe 1932) und eine noch nicht beschriebene Mutante *„Halbzwerg" (Hz)*. Für die Pfropfungen und zur Kontrolle bei den Gibberellinsäure- (GS)Versuchen wurden normale Pflanzen der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* verwendet. Die Mutante *densa* zeichnet sich durch sehr stark gestauchte Internodien aus und vor allem durch sehr kleine Blättchen, während die Mutante *Halbzwerg* nahezu normal große Blätter besitzt und die Blattwirtel durch deutlich erkennbare Internodien getrennt sind. Ihrem Habitus nach würde sie eventuell der von Stubbe (1941) beschriebenen Mutante *inhibita* entsprechen. Die Pfropfungen wurden an 12 Wochen alten Pflanzen durchgeführt, und zwar mit jeder Mutante mindestens 5 und die dazu gehörigen reziproken Pfropfungen. Die Pfropfstelle lag immer über einem Knoten. Die Wunde wurde bis zum Anwachsen des Reises durch Bast und feuchte Watte vor dem Austrocknen geschützt. Als Pfropfreis wurde ein 2 cm langes Stück des Sproßgipfels verwendet. Die nach dem Pfropfen verstärkt austreibenden Achselknospen mußten immer abgeschnitten werden. Bis auf die Pfropfung *normal* auf *densa* (Reis zuerst genannt) gelangen von jeder Pfropfreihe mindestens 4 Pfropfungen. Die Gibberellinsäure (geliefert von Fa. C. Roth, Karlsruhe) gelangte in einer Konzentration von $10^{-5}$ g/ml 3mal wöchentlich, entweder durch Besprühen oder durch Auftropfen von 0,3 ml Lösung auf die Gipfelknospe zur Anwendung. Die Reaktion war bei beiden Applikationsweisen gleich. Begonnen wurde mit den Versuchen 10 Wochen nach Keimung der Pflanzen, wenn der Wuchscharakter der Mutanten zu erkennen war. Die Versuchsdauer erstreckte sich über 3 Wochen bzw. bis zum Blühbeginn.

## Ergebnisse

### *1. Pfropfungen zwischen Antirrhinum majus L. und der Mutante „Halbzwerg"*

Diese Pfropfungen ergaben eindeutige Veränderungen des Pfropfreises durch die genetisch anders gestaltete Unterlage (s. Abb. 1). Bei der Pfropfung *Hz* auf eine normale Unterlage zeigte es sich, daß das Reis eine Streckung der Internodien erfährt, die hierbei eine Länge erreichen wie die eines normalen Sproßes. Nicht mit strecken sich die Internodien, die während des Pfropfens schon ausgebildet waren. Dies scheint im Zusammenhang zu stehen mit dem geänderten Stoff-

Abb. 1 Abb. 2

Abb. 1. Links Pfropfung von *normal* auf *Hz*; rechts *Hz* auf *normal* (1/2 nat. Göße)

Abb. 2. Pfropfung von *densa* auf normale Unterlage (nat. Größe)

transport während des Verwachsens. Im Gegensatz zu der Kombination *normal* auf *Hz* entwickelten sich bei der umgekehrten Paarung die Reiser kräftig weiter. Bei *normal* auf *Hz* entwickelt sich das Reis sehr schwächlich, der Sproßdurchmesser ist sehr klein. Auffallend dabei ist eine häufige Streckung der Nodien. Auch ist das Wachstum des normalen Reises etwas gehemmt. Auf Abb. 1 ist die Pfropfung *normal* auf *Hz* 14 Tage älter als die Kombination *Hz* auf *normal*. Es mag bei der Entwicklung der Reiser mit von Bedeutung sein, in welchem Maße die beiden Partner miteinander verwachsen und dadurch ein entsprechender Stofftransport ermöglicht wird. Es war auffallend, daß die Pfropfungen auf normaler Unterlage relativ gut verwachsen, während es umgekehrt weniger gut gelang.

*2. Pfropfungen zwischen Antirrhinum majus L. und der Mutante densa*

Bei diesen Versuchen wuchsen nur die Pfropfung von *densa* auf *normal* an. Die umgekehrte Paarung gelang bisher nicht. Welcher Art hierbei die Unverträglichkeit war, kann nicht entschieden werden. — Im Gegensatz zum *Hz*-Reis auf normaler Unterlage übte die Unterlage auf das *densa*-Reis keinen Einfluß aus. Dies behielt immer seinen *densa*-Charakter bei (Abb. 2).

*3. Versuche mit Gibberellinsäure*

Gibberellinsäure förderte bei allen behandelten Pflanzen das Streckungswachstum (Abb. 3, 4). Aber nur die *Hz*-Pflanzen erreichen Ausmaße wie eine

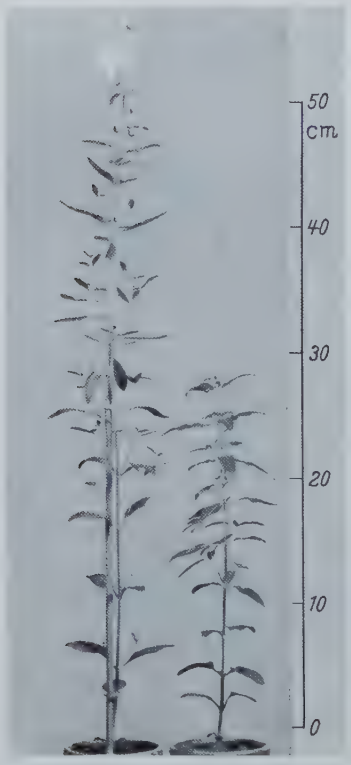



Abb. 3

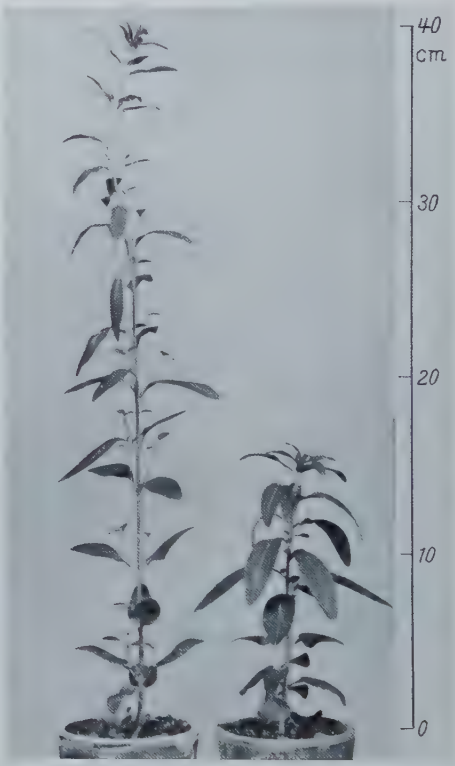



Abb. 4

Abb. 3. Gleich alte normale S 50-Pflanzen von *Antirrhinum majus*. Links mit GS behandelt, rechts unbehandelt

Abb. 4. Mutante „*Halbzwerg*"; links mit GS behandelt, rechts unbehandelt

normale unbehandelte Pflanze. Die Mutante streckte sich auf ein Mehrfaches ihrer Normalform, behielt aber die ursprünglichen Blattdimensionen vorerst nahezu unverändert bei (Abb. 5). Die starke Förderung des Sproßes war bei allen Pflanzen nicht nur auf eine Streckung der betreffenden Sproßzonen zurückzuführen, es wurden auch 1—2 Blattwirtelpaare mehr angelegt. In späteren Stadien war dies allerdings nicht mehr exakt zu erkennen, weil sich die Nodien stark streckten. Letzteres nahm wieder ab, wenn keine Gibberellinsäure mehr appliziert wurde.

Parallel mit der Streckung des Sproßes ging auch eine starke Förderung der Achseltriebe.

Währte die Applikation bis zur Blütenbildung, so war vor allem bei normalen Pflanzen und bei den Halbzwergen zu beobachten, daß an der stark gestreckten Infloreszenz bemerkenswert wenig Blüten, häufig nur 4—5, angelegt wurden und zwischen den einzelnen Blüten vielfach ein bis mehrere nahezu normale Laubblätter sich entwickelten. Außerdem blühten die behandelten Pflanzen 14 bis 18 Tage früher als die Kontrollen. Näheres über die vegetative Entwicklung ist aus der Tabelle zu ersehen.

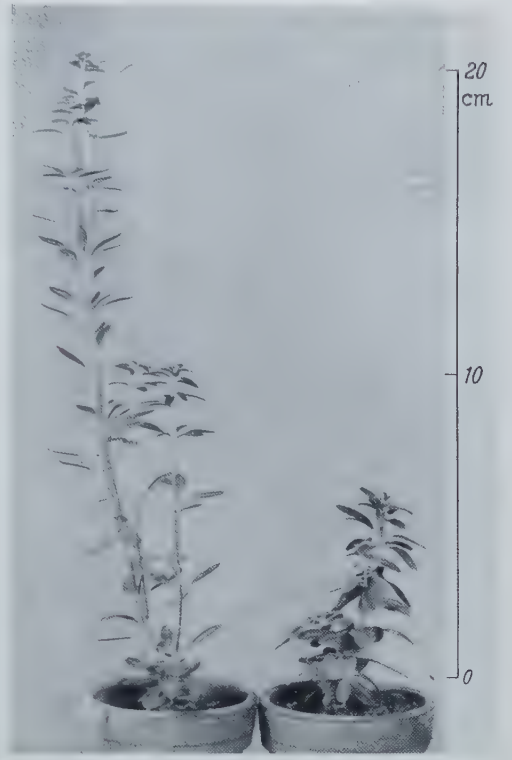


Abb. 5. Mutante *densa*; linke Pflanze mit GS besprüht, rechts unbehandelt

Bei der Mutante *densa* konnte wegen der sehr starken Stauchung die Zahl der Internodien und folglich auch nicht ihre Länge genau bestimmt werden. Auffallend ist, daß die Blätter nicht oder nur unwesentlich in ihrem Wuchs beeinflußt wurden. Es wurden bei den Messungen immer nur 20 der am weitesten entwickelten Blätter genommen. Es zeigte sich, daß sie in ihrer Entwicklung eher gehemmt wurden als gefördert.

Tabelle

| | | Gesamthöhe ab Keimblattwirtel | | Zahl der entwickelten Laubblattpaare | Länge und Breite der Laubblätter | Länge der Internodien | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M | V | | M | 1. | 2. | 3. |
| S 50-Pflanzen . | 2. 5. 59 | 178,0 | 176,7—179,3 | 4 | 45,2 × 22,2 | 18,4 | 20,0 | — |
| S 50-Pflanzen . | 22. 5. 59 | 217,0 | 209,9—225,1 | 6—7 | 46,2 × 23,8 | 22,5 | 28,0 | 30,0 |
| S 50 + GS . . | 22. 5. 59 | 405,0 | 381,9—428,1 | 10—12 | 45,1 × 23,2 | 26,0 | 36,1 | 57,1 |
| *Halbzwerg* . . . | 2. 5. 59 | 81,2 | 74,4— 88,0 | 4 | 42,8 × 27,0 | 8,8 | 9,1 | — |
| *Halbzwerg* . . . | 22. 5. 59 | 97,5 | 88,1—106,9 | 6—7 | 43,0 × 26,8 | 11,0 | 10,5 | 8,5 |
| *Halbzwerg* + GS | 22. 5. 59 | 257,5 | 221,3—293,8 | 8 | 42,4 × 27,2 | 11,4 | 13,4 | 20,2 |
| *densa* . . . . . | 2. 5. 59 | 45,0 | 40,5— 49,5 | — | 31,3 × 8,0 | — | — | — |
| *densa* . . . . . | 22. 5. 59 | 56,0 | 51,0— 61,0 | — | 30,0 × 7,8 | — | — | — |
| *densa* + GS . . | 22. 5. 59 | 92,0 | 80,5—103,5 | — | 32,1 × 7,9 | — | — | — |

M = Mittelwert aus 10 (bei Laubblättern aus 20) Messungen; IV = 95% Vertrauensgrenze. Maßangabe in mm. Die Messungen am 2. 5. 59 wurden vor Versuchsbeginn, die am 22. 5. 59 nach dem Versuchsabbruch ausgeführt.

## Diskussion

### *Pfropfversuche*

Durch die Pfropfversuche sollte nachgewiesen werden, ob es eine in den formbildenden Prozeß eingreifende Substanz gibt, die sich vom Reis auf Unterlage oder umgekehrt übertragen läßt. Bei der Pfropfung *densa* auf eine normale Unterlage ist es nicht der Fall. Die umgekehrte Pfropfung gelang nicht. Anders verhielten sich die Pfropfreiser von *Hz* auf normal oder bei der umgekehrten Kombination. Bei dem *Hz*-Reis auf der normalen Unterlage scheint es so zu sein, daß hier eine Hemmung aufgehoben wird, die in der intakten *Hz*-Pflanze vorlag. Ein Streckungsstoff, der GS-Charakter haben kann (vgl. Brian 1958), wird in seiner Funktion nicht mehr durch einen Stoff gehemmt, der im basalen Bereich oder Wurzel der Pflanze gebildet wird. Libbert (1957) fand bei seinen Versuchen 2 Hemmstoffe in der Wurzel, die die Auxinwirkung hemmen. Bei der Mutante *Hz* kann man einen Stoff vermuten, der das gleiche mit einem ähnlichen Wirkstoff vollbringt. Das würde dann auch erklären, warum das normale Reis auf *Hz*-Unterlage gehemmt wächst. Hier würde der in der Unterlage gebildete Hemmstoff wirksam werden.

Brian und Hemming (1957), Kuse (1958) und andere wiesen nach, daß GS in der Pflanze nur wirksam werden kann in Gegenwart von Auxinen oder bei gleichzeitiger Applikation von IES. Wenn die in der Pflanze vorliegenden Auxine unwirksam gemacht werden, können GS-Gaben kein verstärktes Wachstum erzielen. Lockhart (1957) folgerte aus seinen Versuchen, daß die GS in der Sproßspitze gebildet wird. Dies könnte bei den Zwergformen bedeuten, daß entweder ihre GS-Synthese blockiert ist oder die Wirkung, wie oben angenommen, durch andere Faktoren gehemmt wird. Ersteres kann bei der Mutante *densa* vorliegen. Es scheint unter anderem die GS-Synthese blockiert zu sein, aber nicht allein, sonst müßte durch GS-Gaben ein angenähert normales Wachstum erreicht werden. Zu beachten ist hierbei, daß wahrscheinlich jede Art spezifische GS-ähnliche Substanzen besitzt (Simpson 1958, Radley 1958). Bezüglich der Probleme von Pfropfungen genotypisch verschiedener Pflanzen sei auf die Arbeit von Böhme (1954) und die dort zitierte Literatur verwiesen.

### *Behandlung mit Gibberellinsäure*

Die zahlreichen Versuche, die in den vergangenen Jahren mit GS durchgeführt wurden, zeigten im allgemeinen 2 Ergebnisse. Einmal eine starke Förderung des Sproßwachstums, zum anderen bei Langtagpflanzen eine Förderung des Langtaghabitus bzw. Beschleunigung der Blütenbildung (vgl. Lang 1957, Wittwer und Bukovac 1957 b, Langridge 1957 u. a.), bei den Kurztagpflanzen kann es eine Langtageinwirkung ersetzen (vgl. u. a. Harder und Bünsow 1957, Lona 1958). In dieser Hinsicht überrascht es auch nicht, daß bei *Antirrhinum majus* L. ebenfalls eine Beschleunigung der Blütenbildung zu beobachten war, da die Pflanzen, wenn auch keinen besonders ausgeprägten, Langtagcharakter haben. Sie blühten durchschnittlich 14 Tage früher als die Kontrollen. Ein entsprechender Versuch mit Pflanzen, die im Kurztag gehalten wurden, steht noch aus. Auch in anderer Hinsicht verhielten sich die Pflanzen so, wie schon an anderen zahlreichen Objekten beschrieben.

Auffällig ist bei allen Pflanzen, die mit GS besprüht wurden, daß parallel mit der starken Sproßförderung eine Reduktion des Sproßquerschnittes geht. V. A. Greulach und G. Haesloop (1958a, 1958b) zeigten an *Phaseolus vulgaris*, daß nicht die Stärke der Rinde beeinflußt wird, sondern der Durchmesser des Markes abnimmt, was dann den entsprechend dünneren Sproßquerschnitt zur Folge hat. Die beiden genannten Autoren wiesen auch an *Xanthium pensylvanicum* (1958) und *Phaseolus vulgaris* (1956b) nach, daß die Sproßförderung durch GS nicht nur auf eine Zellstreckung zurückzuführen ist, sondern hauptsächlich auf vermehrte Zellteilungen. Darauf läßt sich auch die Streckung der Nodien zurückführen, die man bei GS-behandelten Pflanzen immer antrifft, und daß mehr Blattwirtel angelegt werden (vgl. Tabelle), wenngleich sie auch auseinandergerückt sind. In einem gewissen Gegensatz zu der Sproßförderung steht, daß die Blätter nicht mit in dieser Richtung beeinflußt werden, sondern in unseren Versuchen eher in der Entwicklung gehemmt bleiben. Die Abweichungen ließen sich allerdings statistisch nicht genau sichern. Bezüglich der Beeinflussung des Blattwachstums durch GS widersprechen sich die Angaben in der Literatur. Haesloop und Greulach (1958) stellten an *Xanthium pen.* ebenfalls eine Reduktion der Blattgröße fest, während Gray (1953) bei Bohnenblättern z. B. eine ziemlich große Förderung maß. Ebenso fand Kribben (1957) an Gurkenkeimblättern durch GS-Injektion eine Förderung. Kuraishi und Hashimoto (1957) untersuchten diesbezüglich Blätter von *Phaseolus*, von *Pisum sativum* und *Raphanus sativus*. Sie beobachteten, daß GS die Blattgröße fördern kann, aber nur, wenn das Blatt isoliert in einem GS-haltigen Medium schwimmt. Aber es tritt kein Effekt auf, wenn das Blatt an der intakten Pflanze bleibt. Man vermutet hier eine Beziehung zu dem starken Sproßwachstum.

## Zusammenfassung

1. Der gehemmte Wuchs bei der *inhibita*-ähnlichen Mutante „*Halbzwerg*" (*Hz*) ist, wie Pfropfungen zeigten, auf die Hemmung der Wirkung eines Wuchsstoffes zurückzuführen, während bei der Mutante *densa* die Synthese eines Wuchsstoffes blockiert zu sein scheint.

2. GS kann bei der *inhibita*-ähnlichen Mutante (*Hz*) den Zwergwuchs aufheben. Der sich entwickelnde Sproß zeigt aber die typischen Merkmale einer GS-Behandlung. Bei der Mutante *densa* läßt sich durch GS der gehemmte Wuchs nicht in dem Maße aufheben. Sie behält charakteristische Merkmale bei.

3. GS fördert bei allen behandelten Pflanzen das Sproßwachstum unter den bekannten Erscheinungen, wirkt aber schwach hemmend auf das Blattwachstum.

4. Die Blütenbildung wird bei normalen Pflanzen und der *inhibita*-ähnlichen (*Hz*) Mutante wesentlich durch GS gefördert.

Herrn Prof. Dr. F. Oehlkers danke ich für die Förderung aller Versuche. Der „Deutschen Forschungsgemeinschaft" bin ich für die Überlassung der nötigen Hilfsmittel zu Dank verpflichtet.

## Literatur

Arnold, H.: Über die spezifische Beeinflussung von Pfropfpartnern bei Tomaten. Wiss. Z. Univ. Greifswald II, naturw.-math. Reihe **5**, 317—325 (1953). — Bergfeld, R.: Mutationsauslösung durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus* L. Z. Vererb.-Lehre **89**, 131—142 (1958). — Böhme, H.: Untersuchungen zum Problem der genetischen Bedeutung von Pfropfungen zwischen genotypisch verschiedenen Pflanzen. Z. Pflanzenzücht. **33**, 367—418 (1954). —

Brian, P. W.: Role of gibberellin-like hormones in regulation of plant growth and flowering. Nature (Lond.) **181**, 1122—1123 (1958). — Brian, P. W., and H. G. Hemming: A relation between the effects of gibberellic acid and indolylacetic acid on plant cell extension. Nature (Lond.) **179**, 417 (1957). — The effect gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. Physiol. Plantarum **8**, 669—681 (1955). — Bukovac, M. G., and S. W. Wittwer: Gibberellic acid and higher plants. I. General growth responses. Quart. Bull. Michigan agric. Exp. Stat. **39**, 307—320 (1956). — II. Induction of flowering in biennials. Quart. Bull. Michigan agric. Exp. Stat. **39**, 650—660 (1957). — Chailakhjan, M. K.: The effect of gibberellin on the growth and development plants. Bot. Z. **43**, 927—952 (1958). — Gray, A. L.: Alteration of leaf size and shape and other changes caused by gibberellins in plants. Amer. J. Bot. **44**, 674—682 (1957). — Greulach, V. A., and J. G. Haesloop: Effect of gibberellic acid on cell division and cell elongation in *Phaseolus vulgaris*. ASB Bull., Tallakassee, Florida **5**, 8 (1958a). Greulach, V. A., and J. G. Wittwer: The influence of gibberellic acid on the cell division and cell elongation in *Phaseolus vulgaris*. Amer. J. Bot. **45**, 566 (1958b). — Haesloop, J. G., and V. A. Greulach: Effects of gibberellic acids on the growth and development of *Xanthium pensylvanicum*. J. Eliska Mitchell Sci. Soc. **74**, 65—67 (1958). — Harder, R., u. R. Bünsow: Über die Wirkung von Gibberellin auf Entwicklung und Blütenbildung der Kurztagpflanze *Kalanchoe bloßfeldiana*. Planta (Berl.) **51**, 201—222 (1958). — Hess, D.: Die Wirkung von Gibberellinsäure auf Entwicklung, Stickstoff- und Nukleinsäure-Gehalt von *Streptocarpus Wendlandii*. Naturwiss. **46**, 408—409 (1959). — Knapp, R.: Über die Wirkung von Gibberellin auf Wachstum und Blütenbildung bei verschiedenen Temperatur- und Lichtverhältnissen. Z. Naturforsch. **116**, 698—704 (1956). — Kribben, F. I.: Gibberellinsäure und Blattwachstum. Naturwiss. **44**, 429 (1957). — Kuraishi, S., and T. Hashimoto: Promotion of leaf growth and acceleration of stem elongation by gibberellin. Bot. Mag. (Tokyo) **70**, 86—92 (1957). — Kuse, G.: Necessity of auxin for the growth effect of gibberellin. Bot. Mag. (Tokyo) **71**, 151—159 (1958). — Lang, A.: Stem elongation in a rosette plant, induced by gibberellic acid. Naturwiss. **43**, 257—258 (1956). — The effect of gibberellin on flower formation. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 709—717 (1957). — Langridge, J.: Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. Nature (Lond.) **180**, 36—37 (1957). — Libbert, E.: Die Regulation des Wurzelwachstums durch synthetische und endogene Inhibitoren. Planta (Berl.) **50**, 25—40 (1957). — Lockhart, I. A.: Studies on the organ of production of the natural gibberellin factor in higher plant. Plant Physiol. **32**, 204—207 (1957). — Lona, F.: Osservazioni orientative circa l'effetto dell'acido Gibberellico sullo sviluppo riproduttivo di alcune longidiurne e bravidiurne. Ateneo parmense **27**, 867—875 (1957). — Oehlkers, Fr.: Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 584—589 (1956). — Phinney, B. O.: Growth response of a single-gene dwarf mutants in mense to gibberellic acid. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 185—189 (1956). — Rappaport, L.: Effect of Gibberellin on growth, flowering and fruiting of the earlypak tomato, *Lycopersicum esculentum*. Plant Physiol. **32**, 440—444 (1957). — Schick, R., u. H. Stubbe: Die Gene von *Antirrhinum majus II*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **62**, 249—290 (1932). — Stubbe, H.: Die Gene von *Antirrhinum majus IV*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 401—443 (1941). — Vlitos, A. I., and W. Meudt: Relationship between shoot apex and effect of gibberellic acid on elongation of pea stems. Nature (Lond.) **180**, 284 (1957). — Wittwer, S. H., and B. J. Bukovac: Gibberellin in higher plants. III. Induction of flowering in longday annuals grown under short day. Quart. Bull Michigan agric. Exp. Stat. **39**, 661—672 (1957).

Dr. R. Bergfeld, Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 483—502 (1959)

Department of Botany, Montana State University, Missoula, Montana;
Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, Long Island, New York

# THE ACTIVITY OF X-RAYED APICAL MERISTEMS: A GENETIC AND MORPHOGENETIC ANALYSIS IN *ZEA MAYS**

By

Otto L. Stein and Dale M. Steffensen

With 15 Figures in the Text

*(Received October 20, 1959)*

A considerable number of studies have dealt with the genetic effects of radiation on barley and maize seeds (e.g., MacKey 1951, Caldecott 1954, 1955, Schwartz 1954, Schwartz and Bay 1956 and Ehrenberg 1955. See Sparrow et al. 1958 for a comprehensive bibliography). In some cases the irradiated seeds were subjected to various pre- and post-treatments and the effects on germination, seedling height and survival were taken as an index of damage. In other experiments chromosome aberrations were examined directly by observing bridges and fragments in dividing cells of seedlings or by determining the number of translocations in the meiocytes of $X_1$ barley plants. Many other experiments have concentrated on recessive seedling mutants found in the $F_2$ generation. In spite of intense research there remain some difficulties in interpreting the actual mechanisms by which chromosome damage reduces seedling and plant growth; and especially in interpreting the growth and survival of individual mutant cells in the apical meristems. It is not at all apparent how loss of chromosome material controls the rate of cell division, cell elongation, differentiation, and other basic processes in growth. In order to obtain more information about these processes the shoot apex and its products were studied throughout the entire seedling ontogeny.

Several factors favored the use of *Zea mays*. It is a genetically well-known plant; its growth habit both morphologically and anatomically has been described in relatively extensive detail and its cytology is well known. The shoot apex of maize produces leaves at orderly intervals (Abbe and Phinney 1951). At time of seed treatment 5 or 6 leaves have already been laid down; after germination about 10 more are formed by the shoot apex. In our strain very little tillering occurred, assuring that only the immediate derivatives of the treated apex were analyzed. Thus the morphological stage at time of treatment can be determined directly and the changes induced can be followed in detail. By studying the distribution of plant color sectors which are the result of chromosome deletions on successively formed leaves one can reconstruct the developmental events within the apical meristem proper.

* Research carried out at Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U.S. Atomic Energy Commission. The study was initiated under a U.S. Public Health Service Cancer Research Fellowship to O. L. S. and completed under AEC contract AT(45–1)–1302. We are indebted to Drs. H. Quastler and A. H. Sparrow for critically reading the manuscript, to Dr. H. E. Reinhardt, Montana State University, for statistical advice, and for technical assistance to Miss B. M. Robinson and Mrs. L. Grodzins and D. B. Stein.

The following experiments were designed to furnish further information about the cytological effects of X-rays on the growing point of *Zea mays* and on the correlation of the cytohistological picture with the observed growth phenomena. Special attention was paid to the genetic implications which can be derived from data of this nature.

## Materials and Methods

The same seed source was used throughout the entire series. The genotype of the seeds was $yg_2$ *C sh bz wx*/$Yg_2$ *I Sh Bz Wx*. This linkage group is located on the short arm of chromosome 9 with $yg_2$ being far enough towards the end of the chromosome so that its loss would not be deleterious to a cell (McClintock 1943, 1944). The female parental material carrying $yg_2$ *C sh wx* was derived from maize stocks of Dr. M. M. Rhoades and Dr. E. J. Dollinger. The male parent which provided the dominant genes was originally obtained from Dr. B. McClintock.

The kernels from several ears were usually pooled and obviously diseased caryopses discarded. The kernels were then disinfected with a 1:5 solution of "Clorox" and water for ten minutes and subsequently rinsed several times in tap water. The seeds were then placed in a beaker which was covered with a plastic mesh through which a plastic hose from the water faucet was inserted. The hose was arranged in such a fashion that the turbulence of the water would continuously but gently move the seed. The objective of this arrangement was twofold. It was hoped that surface spores would be washed away and that uniform aeration could be provided. The general results seem to indicate that this was accomplished. The water temperature was adjusted to 27° C though major fluctuations (25–30° C) did occur.

After 24 hours the seeds were placed in sterilized Petri dishes on moist filter paper, embryo side up. At this time the primary root was about to burst through the coleorhiza. The dishes were then removed to the X-ray facility and treated as indicated. The machine used was a G. E. Maxitron 250, operated at 250 KVP and 30 ma with a 1 mm Al filter, delivering about 1000 r per minute. The seeds were placed on a rotating table 30 cm from the source. During the period of irradiation the glass cover of the dish was replaced with a disc of filter paper. After irradiation the kernels were either placed in Petri dishes in a dark room kept at 26° C, or in the greenhouse singly in 4″ pots, or planted in the field. After two days the seedlings in the dark room were measured for the first time. In the first experiments on dose response (Figs. 1, 3) the seedlings were exposed to laboratory lights for not more than two hours during measurement. This period was reduced to 15 minutes in the second experiment (Figs. 4–9). After the second measurement on day 4 the lids were removed from the Petri dishes and the entire group covered with polyethylene cloth and illuminated by fluorescent lights.

Measurements of root length and seedling height of the Petri dish cultures were made with a steel rule to the nearest millimeter, height of the greenhouse grown plants to the nearest 5 mm.

Anatomical material for examination of the shoot apices was periodically taken at random from the various treatments, fixed in FAA and processed by the tertiary butyl alcohol method. The material was sectioned at 10 $\mu$ in the median plane through the youngest leaf primordium and stained with safranin-fast green.

## Results and Discussion

Preliminary experiments were conducted to determine the ranges of irradiation which would furnish biologically useful information and also in order to explore which criteria of growth and development would be of maximum use. The results of these experiments will be incorporated at appropriate points.

*Dose response during seedling growth.* Corn caryopses were irradiated with 500, 1000, 2500, 3000, 5000, 7000, 11000 and 13000 r. After irradiation the seeds were divided into three Petri dishes per dose, usually ten seeds per dish and then placed in the dark. An aliquot of 30 seeds for each dose except the two highest doses was planted in the greenhouse in individual 4″ pots. The material in the Petri dishes was measured at 2, 4, and 6 days after

irradiation. The root length was measured from the tip of the pierced coleorhiza to the apex of the root. The shoot was measured from the coleoptilar node to the tip of the coleoptile or the maximum extension of the young leaves. The serial position of the leaf measured was recorded. Two days after irradiation only coleoptile length was recorded. Four days after treatment leaf 1 had pierced the coleoptile in many instances and leaf length as well as coleoptile length were recorded in these individuals. For sake of uniformity only coleoptilar measurements were used. Use of leaf length would not have changed the pattern materially.

It is of interest to examine the distribution of individuals which show emerged leaves 1. The data are presented Table 1. At 500 r leaf emergence is below that of the controls, but with increasing dose, at least up to 3000 r, a higher percentage of plants have leaf 1 showing. When compared with the appropriate curve in Fig. 1 the apparent reciprocity of this phenomenon with coleoptile length is rather striking, especially at the 500 r level. This relationship to dose does not hold beyond 3000 r. As will be discussed later, this may well be related to the fact that the "physiological" range of treatment did not extend much beyond 3000 r under these experimental conditions.

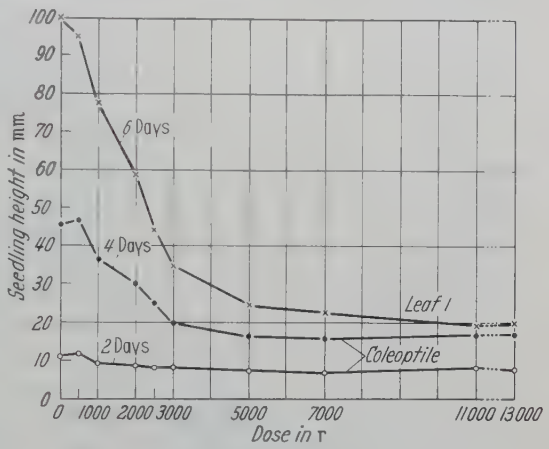



Fig. 1. Height of corn seedlings at 2, 4 and 6 days after X-irradiation. Material grown in Petri dishes

Six days after treatment we deal with a group of seedlings whose youngest leaves were either leaf 1 or 2. Again for reasons of conformity and because leaf 1 has frequently been used as the radiation sensitivity index the length of this leaf only has been considered. If absolute seedling height had been presented it would have raised the curve in Fig. 1 by no more than 5%. In Table 1 the pattern

Table 1. *Percent of seedlings showing leaf 1 or leaf 2*

| Days after treatment | Control | Dose (r) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 500 | 1000 | 2000 | 2500 | 3000 | 5000 | 7000 | 11000 | 13000 |
| 4 (Leaf 1) . | 3,7 | 0,0 | 3,6 | 20,0 | 12,0 | 34,8 | 10,3 | 12,9 | 19,2 | 7,1 |
| 6 (Leaf 2) . | 16,7 | 0,0 | 8,3 | 63,0 | 50,0 | 55,0 | 15,4 | 14,8 | 8,7 | 0,0 |

for day 4 is repeated on day 6. One can but conjecture as to the reason for this effect. Skoog (1935) found that irradiated *Avena* coleoptiles would exceed the controls in length after a short inhibitory phase. He attributed this to the fact that the irradiated primary leaf does not pierce the coleoptile as soon as in the control; thus the irradiated coleoptile will continue growth over a longer period of time. Since we observed this effect only at relatively low dosages Skoog's explanation does not seem to fit this situation. The assumption that in this dose range cell elongation is more inhibited by irradiation than cell division would explain the observed results. (This would be somewhat unusual, since ordinarily

cell division is considered to be more sensitive to radiation than cell elongation.) At this stage of development the coleoptile increases mainly by cell elongation. Leaves 1 and 2 grow by both elongation and division. However, since leaf 2 was younger than leaf 1 at time of irradiation it may be assumed that a larger percentage of cells would undergo cell division in leaf 2 and thus less cells would be susceptible to any interference with the elongation phase. The histological data support this. From Table 6 it can be seen that in the coleoptile there is a decrease of cell size with increasing dose at the lower ranges.

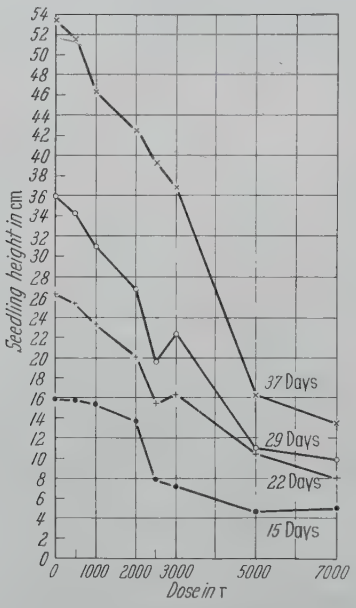



Fig. 2. Height of corn seedlings at 15, 22, 29 and 37 days after X-irradiation. The plants were grown in a greenhouse

In general, Fig. 1 presents quite a typical picture of the results obtained in several experiments of this nature. After only 2 days the effect of the irradiation on shoot growth can be observed. At 4 days the effect is greater. Plants which were given only 500 r actually exceed the controls in height. "Stimulation" of growth at low doses of irradiation has frequently been reported in the literature and has been reviewed by Breslavets (1946) (see also Sparrow et al. 1958). In these experiments this effect does not persist as can be seen from the 6 day curve in Fig. 1. This group of plants eventually conforms with the almost straight line relationship of plant height to dose. As can be seen more clearly from the greenhouse data (Fig. 2) cessation of growth occurs between 3000–5000 r. Cells cease to divide at this dose level as will be discussed in a later section.

The curves in Fig. 1 are somewhat atypical in that at high doses an increase in seedling height is usually observed during the first few days. Such an increase in height at high doses is quite well demonstrated in Fig. 4. This growth response has been reported by Schwartz (1954) and Sicard and Schwartz (1959) and may be due to inhibition of mitosis and greater cell elongation (Schwartz and Bay 1956).

Root growth under these conditions appears to be very similar to the behavior of the shoot. This can be seen in Fig. 3. Here too there exists a temporary stimulatory effect at 500 r and also a disproportionate elongation at very high doses. The drop in average root length at 6 days in the 13000 r group is an artifact produced by the inclusion of roots which probably had died at an earlier stage. In this series one would not expect further development in any group that had received more than 5000 r. As will be shown in the greenhouse grown material, actually only the 3000 r group showed active growth. Most of the individuals of the 5000 r group will continue development of those organs already layed down, but apparently no new ones are produced. It was quite striking to observe that there appeared to be a correlation between root length at day 5 and survival potential. If a seedling had a root which did not exceed ca. 35 mm

in length it was very likely that the plant would not continue to develop (cf. QUASTLER et al. 1952). The almost constant root length at the lethal dose must represent some index of amount of damage a cell can support and still divide. A rough approximation here would suggest one or two further divisions for a severely affected cell.

Another striking correlation was the degree of secondary root formation and survival. As can be seen in Table 2 the percentage of individuals with secondary roots shows a fair correlation with the dose of irradiation received and this in turn reflects the number of survivors at any particular dose. The absence of secondary roots suggests that the effects of irradiation on root growth are complex.

Table 2. *The percentage of primary roots which have formed lateral roots*

| Dose (r) | Second. rts. / Prim. rts. | Percent |
|---|---|---|
| Control | 23/23 | 100 |
| 500 | 18/18 | 100 |
| 1000 | 24/24 | 100 |
| 2000 | 21/27 | 77,8 |
| 2500 | 3/22 | 13,6 |
| 3000 | 4/20 | 20 |
| 5000 | 6/26 | 23,1 |
| 7000 | — | 0 |
| 11000 | — | 0 |
| 13000 | — | 0 |

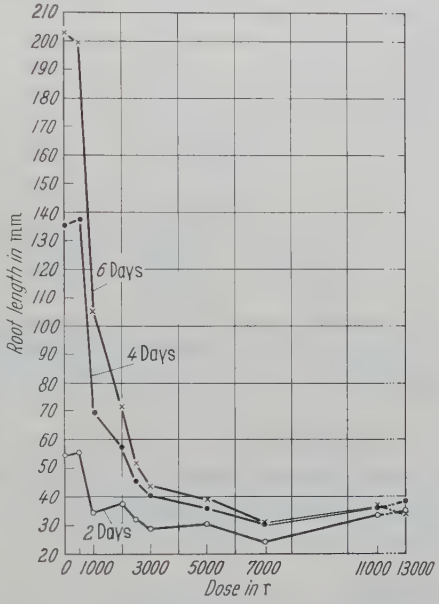



Fig. 3. Root length at 2, 4 and 6 days after X-irradiation. The plants are the same as represented in Fig, 1

As mentioned previously an aliquot of irradiated seeds was planted in the greenhouse and these seedlings too, were measured periodically. However, only maximum leaf extension and leaf number were determined. At day 45 after irradiation all "mature" leaves were measured. As can be seen from the curves in

Table 3. *Number of survivors after X-irradiation at various doses*

| Days after irradiation | Control | Dose (r) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 500 | 1000 | 2000 | 2500 | 3000 | 5000 | 7000 |
| 15 | 29 | 22 | 25 | 25 | 28 | 21 | 8 | 12 |
| 22 | 28 | 22 | 25 | 25 | 17 | 10 | 3 | 6 |
| 29 | 28 | 22 | 25 | 25 | 16 | 9 | 3 | 2 |
| 37 | 28 | 22 | 25 | 23 | 10 | 6 | 3 | 1 |
| 45 | 28 | 22 | 25 | 21 | 9 | 6 | — | — |

Fig. 2 the growth pattern of older seedlings is slightly different from that of very young seedlings in Petri dishes. When first measured in the greenhouse 15 days after planting (the first shoot tips broke the surface of the soil at 4 days after irradiation) the dose response in terms of plant height can be presented graphically as a sigmoid function. In Table 3 it can be seen that in part the sigmoid shape

of the curve is produced by the inclusion of plants which had stopped growing but were measured. Later these plants died and at 37 days after irradiation the dose response can be represented as a linear function. The phenomenon is particularly noticeable at the 2500 r dose. Here a considerable deviation from

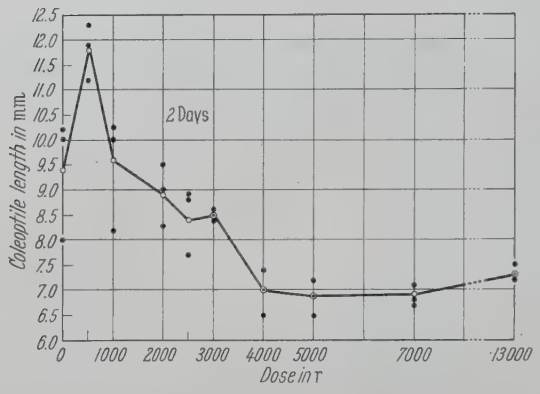



Fig. 4

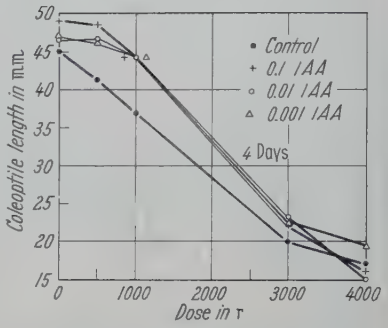



Fig. 5

Fig. 4. Coleoptile length of X-irradiated corn seedlings 2 days after irradiation. Black circles are means of individual replicates. White circles are means per treatment. Petri dish material

Fig. 5. Coleoptile length four days after X-irradiation. The indoleacetic acid (*IAA*) was applied 2 days after irradiation. Same population as Fig. 4

the smooth curve can be observed at 22 and 29 days after treatment. In Table 3 it is shown that at lower doses severely affected seedlings do not die as soon after exposure as do the plants given higher doses. Once these plants do drop out of the population the data will fit a straight line very well.

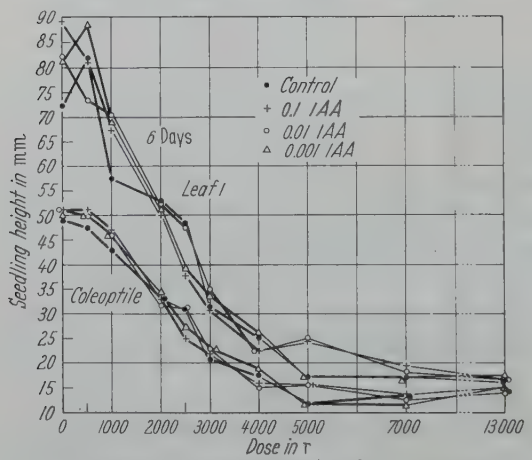



Fig. 6. Height of coleoptile and leaf 1, 6 days after irradiation. Same population as Figs. 4 and 5

From these observations it becomes clear that an analysis of radiation damage based on infrequent sampling may be quite misleading. Unless the basic pattern of growth and development of the organism studied is well known, both under normal and experimental conditions, it is highly desirable that measurements be taken throughout the ontogeny of the plant. Only then can the effect of irradiation on the population as well as the individual be considered.

*The effect of indoleacetic acid on dose response during seedling growth.* The foregoing data suggested that possibly some feature of the radiation damage could be overcome and thus either the lethal dose could be raised or possibly a larger number of individuals be carried along at the partially lethal doses.

To this end the following experiment was designed. Seeds were treated as originally described and irradiated with 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 7000, and 13000 r.

After 2 days of growth the seedlings were measured and after rinsing of the Petri dishes equal volumes of 0.1, 0.01, 0.001 ppm indoleacetic acid (IAA) were added. After another 2 days the procedure was repeated. Since a very large number of seedlings was involved on the fourth day only those doses were sampled which would give the most useful information.

As can be seen from Figs. 4–6 the general pattern of response of the coleoptile to irradiation is the same as in the first series of experiments. The curves also offer a comparison of the effect of the addition of various concentrations of IAA. The most effective concentration appears to be 0.1 ppm, and the difference in response can readily be noticed 2 days after addition of the auxin, day four after irradiation (Fig. 5). The addition of IAA not only increased the length of the coleoptile of the unirradiated seedlings but it was especially effective at the 500 and 1000 r levels. At the latter dose coleoptile length nearly approached the length of controls. The general effect on the dose response curve is a change from linearity to sigmoid form. This effect persisted through day 6 (Fig. 6) when the experiment was terminated. The critical survival dosage was again between 3000 and 5000 r. The addition of IAA had no obvious effect on survival.

A slightly different situation presents itself when leaf 1 is considered under these conditions (Fig. 6). The "stimulatory" effect can be observed at 500 r. The growth enhancement due to IAA is primarily in the length of the leaves of unirradiated plants.

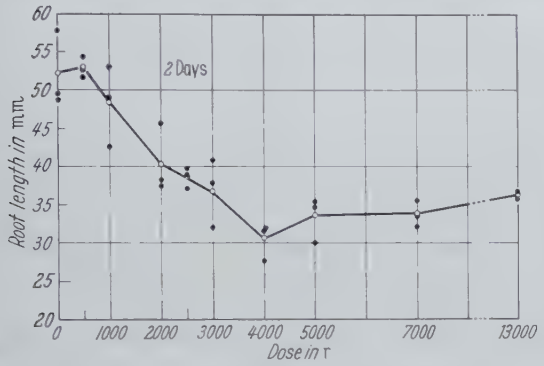



Fig. 7. Length of primary roots of X-irradiated corn seedlings 2 days after irradiation. Black circles are means of individual replicates. White circles are means per treatment. Same plant population as in Fig. 4

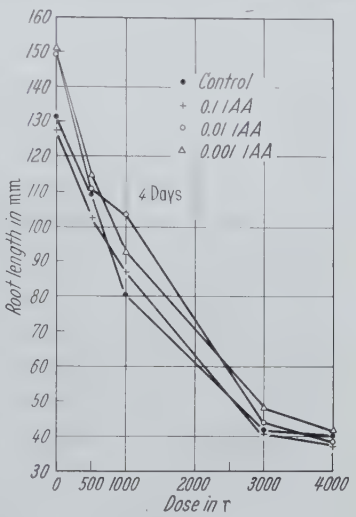



Fig. 8. Primary root length of corn seedlings 4 days after X-irradiation. 1.1.1 was applied 2 days after irradiation. Same population as in Fig. 5

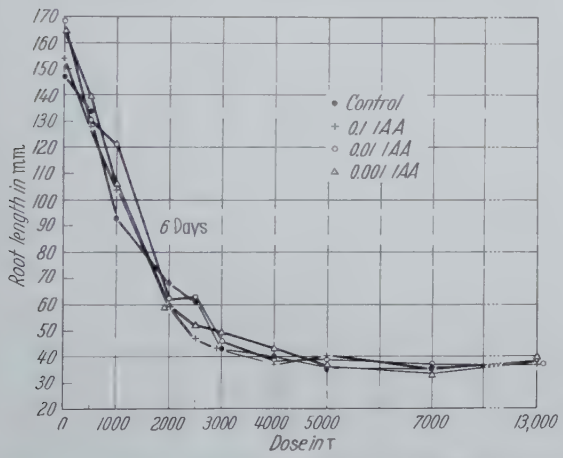



Fig. 9. Length of primary roots of corn seedlings 6 days after X-irradiation. Same population as Fig. 8

The response of the root to irradiation and IAA treatment is shown in Figs. 7–9. A noticeable elongation of unirradiated roots occurred due to the addition of IAA. However, both at day 4 and day 6 the roots which received 1000 r and then were fed IAA showed considerable increase in length over non-IAA treated roots. There is some indication that lower concentrations of this substance were more effective in roots.

Our results are somewhat different from those reported by Gordon (1955). The latter could not observe any effect on oat coleoptile elongation at doses below $10^4$ r, and up to $10^5$ r the inhibition was reversible by the addition of IAA. His observations were made 12 hours after irradiation. Whether a longer time course would have given results similar to those obtained by us is an open question. The fact that we even obtained "stimulation" of elongation at low doses in several experiments suggests that the system involved may not be a simple one.

*The ontogeny of the shoot apex in relation to sector production in leaves.* Thus far all the data discussed dealt with the effect of irradiation on rate of development of the root or the shoot. These results represent a combination of physiological and genetic disturbances. However, we have no means of assigning relative importance to any of a multitude of these effects. We felt that if we could follow the effect of irradiation on one gene throughout the ontogeny of the plant this might give us some correlation of amount of genetic damage observed with over-all plant growth. It was for this purpose that a stock heterozygous for yellow-green ($yg_2$) had been chosen. Since this gene is near the end of the short arm of chromosome 9 any breakage event in the chromosome between the region carrying the dominant allele between $Yg_2$ and the centromere, would be expressed as a sector of light green cells surrounded by tissues composed of normal green cells. Although an albino mutant might have been easier to recognize and to score, it was believed that chromosome loss carrying $Yg_2$ was less likely to cause death or reduced life of the cell thus avoiding the danger of cell competition (see McClintock 1943, 1944). In this experiment no obvious difference in growth between green and yellow-green tissues was noticed.

In our experiments we have not attempted to distinguish between single losses of the dominant $yg_2$ and sectors which were yellow-green in phenotype but could have been due to losses of other chlorophyll controlling factors. The appearance of phenotypes other than $yg_2$ sectors would depend on the loss of both chromosome arms carrying that particular factor and would therefore be of much lower frequency. These assumptions are borne out by studies of other workers. Chlorotic streaks were noted in corn seedlings by Randolph (1950) and Anderson et al. (1949) in seed from an atomic bomb blast. MacKey (1951) observed sectoring with neutron irradiation in barley seed but X-rays did not produce significantly more sectors than found in untreated material. In general it would appear that sectoring in homozygous plants occurs from loss of two homologous chromosome arms and the frequency of this event would be relatively low in X-irradiated material.

From what is known of leaf histogenesis in monocotyledons we would expect long mutant sectors in linear files rather than irregular patches and the earlier in ontogeny the mutation occurred the longer the sector should be (Stein and Steffensen 1959). The total number of yellow-green sectors per leaf should give relative information on the amount of genetic damage, and its change with dose received (Cuany et al. 1958). The aforementioned relationship concerning the amount of somatic mutation per unit dose will be discussed first since it is the simplest to assay.

Leaves of the irradiated plants were examined for color sectors when their blades were nearly mature. This meant that the populations had to be examined several times. Leaves 1 and 2 could not be used in the various assays because their sectors were too small for accurate determination. The other leaves fall into two natural groupings; leaves 3–6, which were present at time of irradiation and 7–12 which were produced by the shoot apex after irradiation. At time of irradiation a sample of embryos was dissected and examined for the number of leaves formed. In all cases leaf 6 was present as a small but distinct primordium. Later observations confirmed this, since it was the one leaf which had an almost evenly divided mixture of short streaks and sectors running the full length of the blade. The short sectors could occur only if some leaf tissue had been laid down already and the long sectors would occur primarily where so few cells represented the meristem that some of these cells would give rise to a complete lineage of mutant progeny.

The average number of yellow-green mutations per leaf is shown in Fig. 10. The assumption was made that each sector represents one mutational event.

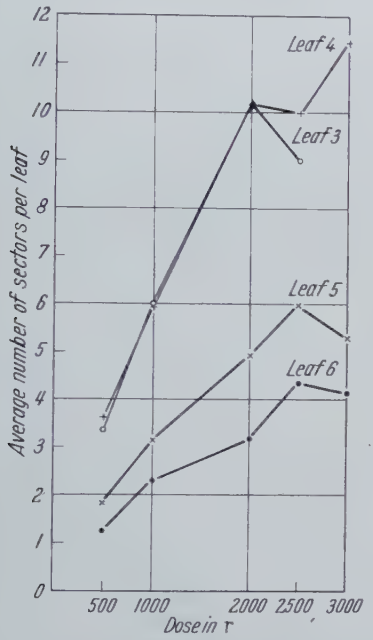



Fig. 10

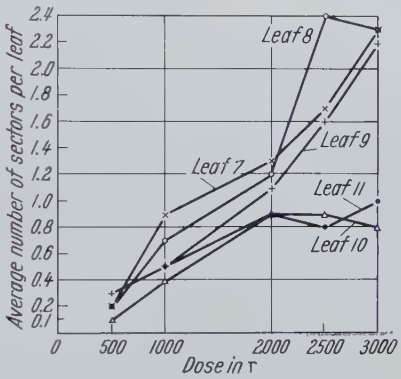



Fig. 11

Fig. 10. Sector frequency of leaves 3 to 6 of corn seedlings. These leaves were present in various stages of development at time of X-irradiation. The corn caryopses had been soaked in water at 27° C for 24 hours before treatment. The seedlings were grown in the greenhouse

Fig. 11. Sector frequency in leaves 7 to 11 of corn plants. These leaves were formed by the apical meristem after irradiation. Same material as in Fig. 10

It can be seen that in all leaves the number of mutations is essentially linear with dose. The deviations from linearity at the higher doses can be partly explained. At 2500 and 3000 r the number of leaves per dose examined did not exceed 6. This was in part due to the smaller number of plants surviving and to their leaves being more subject to disease and thus not scorable. The curves also generally reflect the stage of development at which the leaves were irradiated; the younger the leaf, the fewer cells present, the fewer mutant sectors. Whether the difference in slope between leaves 3 and 4 on one hand and leaves 5 and 6 on the other is biologically significant is open to question. No yellow-green streaks were observed on the controls. Average length of sector did not vary with dose.

The second category includes the leaves which were initiated after irradiation and are presented graphically in Fig. 11. The ordinate here is of much lower magnitude than in Fig. 10, as would be predicted if one considers the mechanism

of leaf formation. The mutant sector now observed had to arise from the meristematic capital of the apex proper and not from the primordia as is the case in leaves 3–6. Leaves 7, 8, and 9 show an essentially linear response with mutant sectors plotted against dose. Leaves 10 and 11 show a surprising deviation from linearity. Both leaves show a linear mutation response up to 2000 r but additional irradiation does not produce any additional mutant sectors in surviving plants.

These results can be explained if one considers the ontogenetic development of a corn shoot. The shoot apex must contain the meristematic capital for several leaves. Riding the crest of the meristem is a small number of cells which could be considered the "mother cells" since they maintain the meristem by continued division. Cells which are destined to give rise to leaf primordia can probably sustain a larger amount of damage than those of the "mother cell" group. The former are greater in number and since some differentiation has already occurred, there is less opportunity for cell competition. In addition "cross-feeding" by adjacent cells may permit continued development of slightly damaged cells. This would explain the linear pattern of mutant sectors plotted against dose for leaves 7–9. The "mother cell" group, on the other hand, consists of relatively few cells and their primary function is cell division. Opportunity for cell selection is, therefore, greater here than in the subjacent region, and only those cells will contribute to the growth of the apical meristem which have not been so severely damaged that they are at a competitive disadvantage. From our data it appears that the critical dose controlling the survival of these cells is between 2000 and 3000 r or ca. 0.9 sectors per leaf. Apparently a few cells can be severely damaged and divide only once or twice. These cells will continue to be part of the meristem but will not contribute to its further growth and to the production of new organs. Gray and Scholes (1951) consider this to be the case in the root apex and its derivatives. The cells which do continue to divide and ultimately give rise to new leaves apparently can carry some chromosome losses, in our case represented by about one yellow-green sector per leaf.

An estimate of the number of cells composing the initial group has been made by Anderson et al. (1949) by scoring sectors of aborted pollen in maize tassels. From their data they concluded that 7 or 8 cells made up the critical group. We observed in one plant one sector which was first seen in leaf 9 and could be traced through all the successive leaves of both orthostichies into two branches of the tassel. It is of interest that leaf 9 is the first leaf carrying this mutation. According to our hypothesis this is exactly the leaf whose primordial progenitors would be located at the tip of the apical meristem at time of irradiation. Since the average width of this sector was 18% of the width of the blade, one can infer that there are about 5–6 cells across the uppermost tier of the apex. A sector which occurs in the leaves of both orthostichies must have arisen from a single cell which cut off daughter cells to either plane of leaf insertion. In most cases a mutant sector will at best cover only two to three leaves in the same orthostichy. The probability of obtaining a specific mutation in a central cell such as discussed above is slight. One of us (O. L. S.) has observed this once before in the case of an orange stripe mutation.

The saturation level of sectors per leaf in leaves 10 and 11 occurs at 2500 r. From Table 3 we see that the 50% seedling survival also occurs at about 2500 r.

The direct correspondence of these values would indicate that at this critical dose two similar phenomena contribute to the saturation effect. On the plant population level 50% of the individuals die because their meristems cannot tolerate the amount of radiation received. In the surviving meristems (or plants) only those cells with minimal damage will continue to divide and produce a significant number of progeny. These two processes contribute to an all-or-none survival pattern. This is graphically shown in Fig. 12. The number of sectors in leaf 11 is plotted against a curve representing surviving seedlings. Not only do these curves intersect at the $LD_{50}$ but at higher doses the survivors do not carry any additional mutation load. GAUL (1957) came to similar conclusions based on mutant frequency of barley seedlings in the $X_2$. The percentage of mutant plants decreased in those groups where the $X_1$ had been permitted to tiller. He suggested that additional tillers must have arisen from less differentiated meristems than those which gave rise to the first few inflorescences. There was probably less chance for cell selection in the meristems which were already established at time of irradiation and possibly "cross-feeding" contributed to the survival of a few heavily damaged cells. Thus the inclusion in the sample of ontogenetically younger tillers, where cell selection had taken place, would tend to decrease the percentage of mutant offspring.

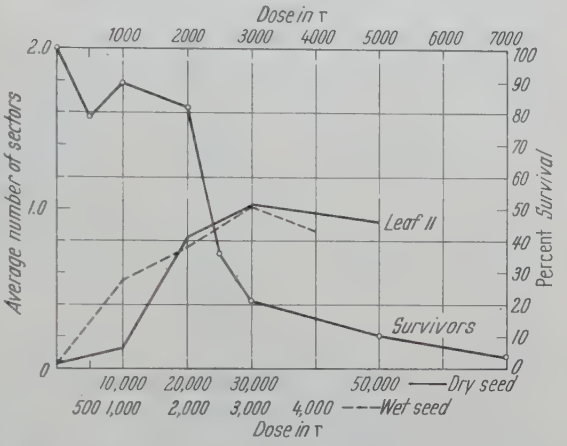



Fig. 12. Sector frequency in leaf 11 compared with survival of corn plants. The survivor curve was obtained from greenhouse grown material. The caryopses had been soaked in water for 24 hours before irradiation. The leaves represented by the broken line come from a field grown population treated as above. The solid line represents leaves 11 from field grown plants whose caryopses had been irradiated in the "dry" state

Direct evidence that chromosome 9 was involved in the yellow-green sectoring is provided by the following observations. One sector continued into two branches of the tassel. In these two branches 50% of the pollen grains were aborted and of the surviving pollen grains 28% tested for dominant *Wx* indicating 28% recombination between *Wx* and the breakage end. From the linkage values of RHOADES (1955) it would appear that the break was near *C*. Many other tassels showed regions of semi-sterility. In these cases the ratio of *Wx*:*wx* was approximately 1:1, indicating that other chromosomes than number 9 were involved. ANDERSON et al. (1949) have analyzed the distribution of semi-sterile sectors in detail. These authors in their conclusions emphasized the importance of following the developing embryo. They also observed that chlorophyll-deficient sectors decreased in successively younger leaves.

*Sector distribution in mature plants resulting from irradiation of dry and wet seeds.* Since the experiment just discussed was limited by its sample size an additional series was set up.

Because of the much greater number of plants used we had to resort to field planting after irradiation. In order to test whether seed treatment would affect the response of the meristems two major populations were planted. One lot of seeds was held in a desiccator over saturated sodium bisulfate for six days prior to irradiation to maintain 52% relative humidity. These seeds will be referred to as dormant or "dry" seeds. This group received 10000, 20000, 30000, and 50000 r. Another lot was soaked in water for 24 hours as previously described and then treated with 500, 1000, 2000, and 4000 r. The "dry" seeds were X-rayed and planted one day before the soaked lot. The number of seeds per group were apportioned so that ultimate numbers of survivors would be approximately equal. Only the 50000 r group proved to have received too heavy a dose to provide a large number of survivors. All the other dosages are represented by at least 30 individuals but usually 45. A third lot of seeds was irradiated with 1000 r after soaking for 72 hours and then kept in a controlled temperature room at about 75° F. This group showed a considerable amount of damage in the young leaves, but its genetic damage was not much different from that of the 1000 r group which was soaked for 24 hours only.

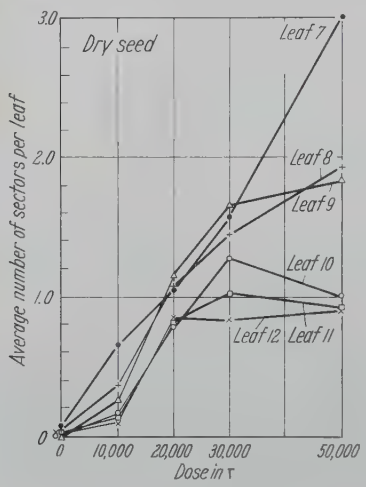



Fig. 13

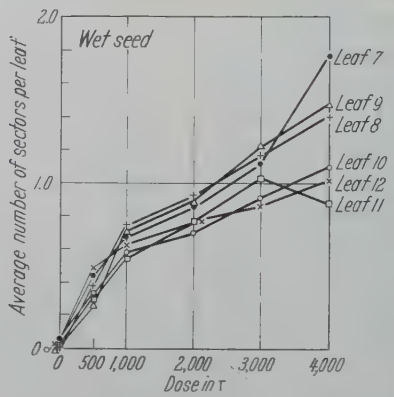



Fig. 14

Fig. 13. Sector frequency of leaves 7 to 12 of field-grown corn plants whose caryopses had been irradiated in the "dry" condition

Fig. 14. Sector frequency of leaves 7 to 12 of plants whose caryopses had been soaked in water at 27° C for 24 hours before X-irradiation. Field grown material

After germination the succession of leaves on individual plants was marked by leaf punches. Beginning with leaf 7 the plants were scored every other day for mutant sectors.

Dry seeds. — The data obtained are presented graphically in Fig. 13. As in the earlier experiment, two patterns are apparent—that of leaves 7–9 and that of leaves 10–12. Essentially these data confirm the observations of the first experiment. The linearity of mutation to dose response in leaf 7; a drop in number of mutations observed at the higher doses in leaves 8 and 9 and then in leaves 10–12 a change in slope of the curve at the lower doses and the appearance of a definite upper limit of slightly less than one yellow-green sector per leaf. Leaf 12 shows this ideally. We should point out here the consistently low response of the 10000 r group after leaf 7. There is no obvious explanation for this phenomenon.

Soaked seeds. — The data observed for 24 hours soaked seed are graphed in Fig. 14. The patterns described for the previous group can be found here too though not expressed as sharply. Again of interest is that the maximum amount of $Yg_2$ loss is approximately one sector per leaf. Possibly the use of another

treatment group at a higher dose would have established this point more definitely.

It thus seems clear that the amount of genetic damage in the somatic tissue of the corn plant is ultimately limited to the amount of damage that a meristem can support and still perform its normal functions. Several modifications of seed treatment did not affect this upper limit, even though the growth pattern of the plant may have shown the effect of the alternate treatment.

Detailed examination of the field-grown material was impossible because of the large number of plants involved. However, the mention of several observations is pertinent here. Sector width was usually around 3 mm. Occasionally sectors up to 2 cm could be seen though this occurred in leaves younger than 9. The major exception were chimeras at the margins of leaves. These generally varied from 5–10 mm and more. This is to be expected since it is known that the width of the grass leaf is dependent on the circumference of the shoot apex and that lateral growth is largely restricted to the margins. Of interest here is that not infrequently one leaf would possess a sector on each edge. This would indicate that the lateral overlap of the margins must occur quite early in the ontogeny of the leaf.

Another frequent occurrence in irradiated corn leaves is a deep dissection of both halves into a split blade running $^1/_3$ to $^1/_2$ the length of the leaf. The cause of this is unknown to us. It may be a stress phenomenon referring back to the early stage of ontogeny when the leaf is not only furled about the shoot apex but also folds over the meristem and younger leaves, thus doubling back on itself.

*Shoot apex anatomy.* The anatomy of the normal shoot apex of corn has been described sufficiently (Abbe et al. 1941, 1951) so that it need not be repeated here. During the course of the dose response experiments representative seedlings were removed on each sampling date and processed for anatomical observation. In Table 4 the dosages sampled and the number of individuals per sample are given. It can be seen that the control seedlings at two days after initiation of the experiment still were in leaf stage 6.0 but after six days the sampled shoot apices were in leaf stage 7.6, i.e., three apices had produced 8 leaves and two had produced 7 leaves. The 2000 r group appears to grow slightly faster than the controls. However, the small sample does not permit any certainty in this respect and the performance of sib plants in the greenhouse indicates that if this effect is real it is transitory. The significant feature of Table 4 is, however, that from 7000 r upward only half the shoot apices produce one more leaf primordium and the other half produce none before the lethal effects of radiation become manifest. The histological evidence suggests that this additional primordium may actually be in most cases merely differentiation of meristematic capital which is already

Table 4. *Average leaf stage of corn seedlings at successive dates of sampling and number of individuals preserved*

| Days after X-ray | Control | Dose | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2000 r | 5000 r | 7000 r | 13000 r |
| 0 | 6.0 (10[1]) | | | | |
| 2 | 6.0 (3) | 7.0 (2) | — | 6.0 (3) | 6.0 (2) |
| 4 | — | 7.0 (3) | 6.0 (3) | 6.3 (3) | 6.0 (3) |
| 6 | 7.6 (5) | 8.0 (3) | 6.8 (6) | 6.5 (6) | 6.5 (6) |

[1] Number of individuals in sample.

present at time of irradiation. At any rate, even though the growing point may have been inactivated at the higher dose, the leaves which were already present

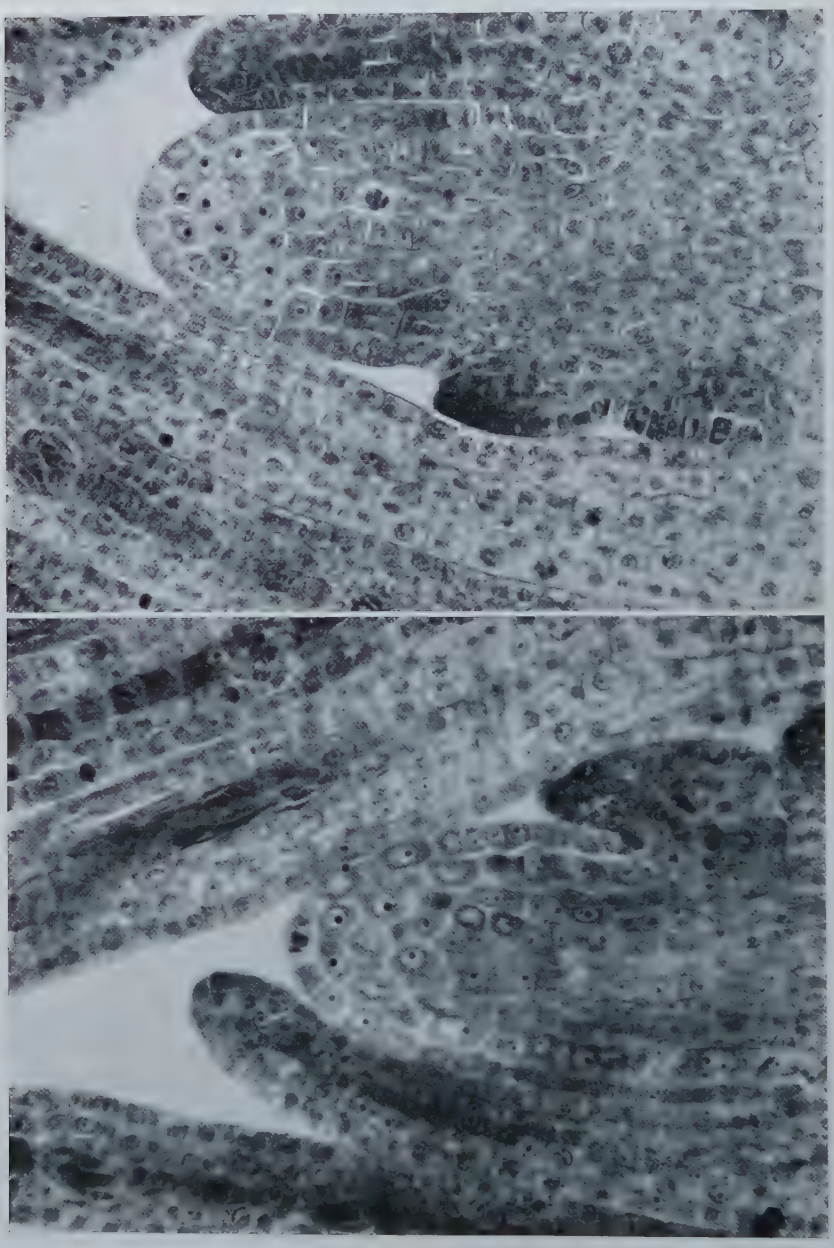


Fig. 15. a Shoot apex of unirradiated seedling at 2 days after initiation of experiment. Note anticlinal division at the tip of the tunica. Youngest leaf shown is No. 6. × 330; b Shoot apex of control seedling 6 days after initiation of experiment. Leaf 7 has been formed on the left side. × 330

at time of irradiation can continue growth for some period of time as can be seen from Fig. 2. However, from the genetic point of view these plants are already eliminated from the population.

Shoot apices of plants which received 7000, 2000, 13000 r and their controls are shown in Figs. 15c, d, e and a, b, respectively. The control (15b) is in plasto-

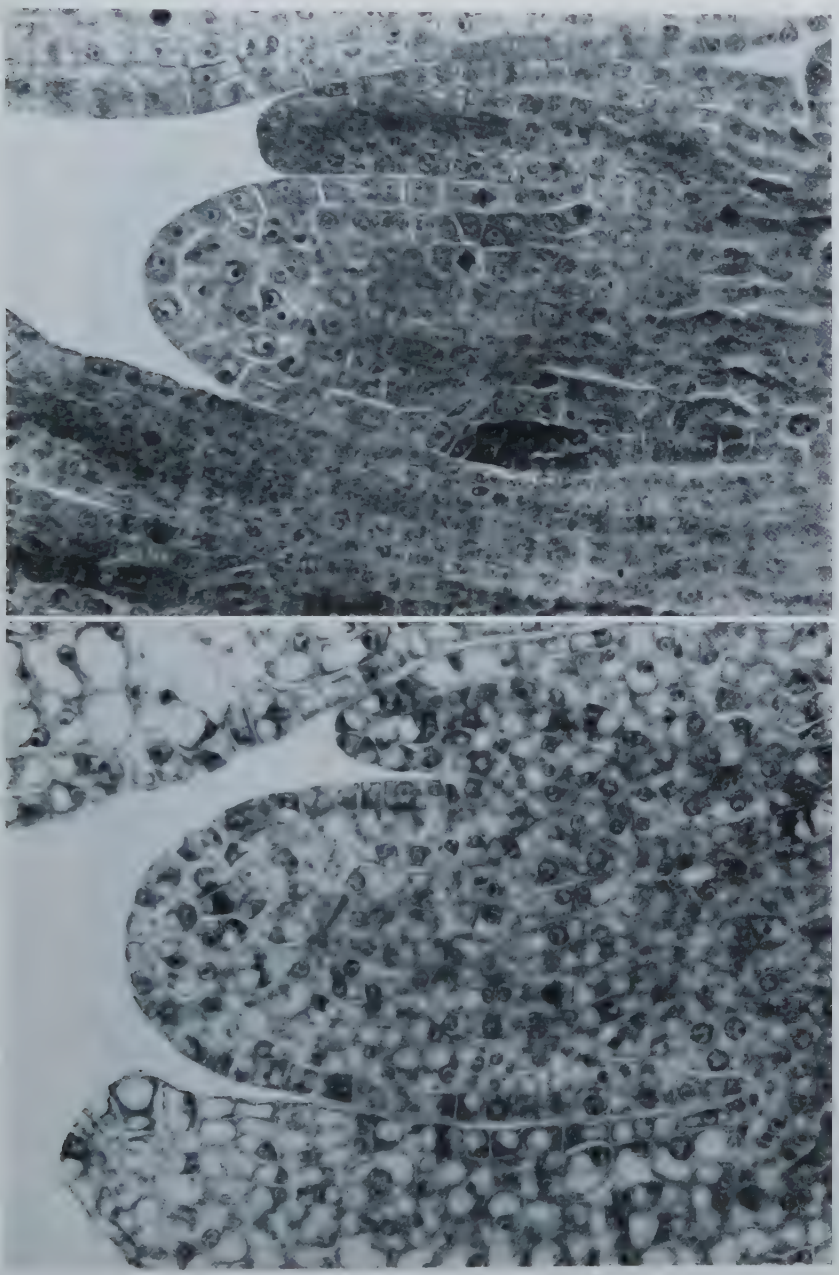


Fig. 15. c Shoot apex of seedling irradiated with 7000 r. At 6 days after irradiation leaf 6 is still the youngest one present. Note relatively large vacuolated cells. × 330. d Shoot apex of seedling irradiated with 2000 r. After 4 days initiation of a new leaf (No. 7) is indicated by periclinical divisions on the left side of the apex. × 330

chron 7 at 6 days after treatment. Apices of seedlings which received no more than 2000 r showed no evidence of dead cells or irregularities of cell lineages which would indicate that a significant number of cells are not continuing cell division.

Of greatest interest, however, is the fact that up to 4 days after irradiation the shoot apices in all dosages look rather alike. There may be some evidence of

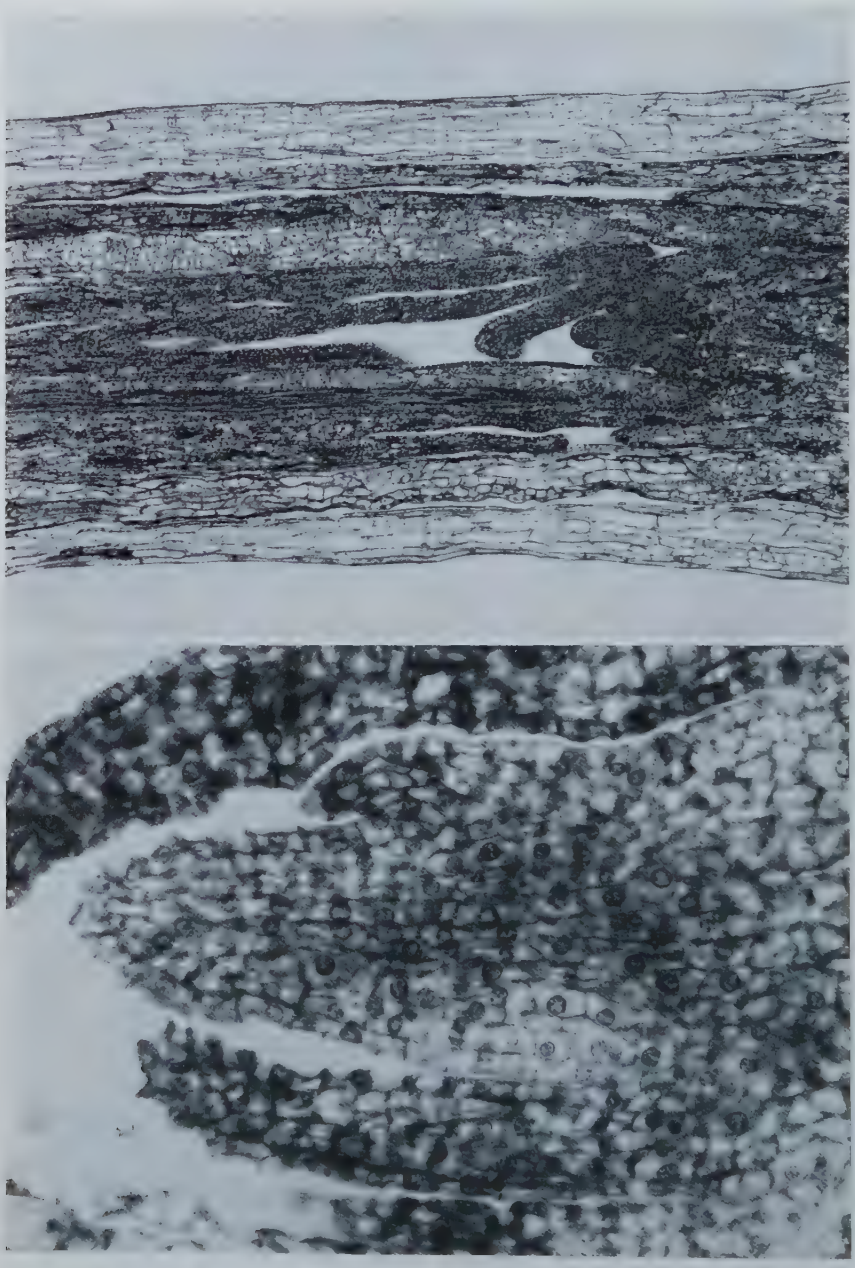


Fig. 15. e Shoot apex irradiated with 13000 r. After 6 days leaf No. 6 is the youngest one present. Note highly vacuolate cells, shriveling of cell walls. × 330.; f Low power view of median section through a seedling which received 7000 r. Six days after irradiation. Note irregular cell sizes and disturbance of cell lineages especially in the coleoptile and leaf 1. × 50

vacuolation and a few micronuclei, but these features really do not become pronounced until 6 days after irradiation. At that time those apices having received 13000 r show signs of collapse. All the cells have become highly vacuolate,

contain many micronuclei, and the cell walls take on a corrugated appearance. This cellular collapse appears as an all or none phenomenon. Either a shoot apex consists exclusively of these cells or it consists of relatively normal appearing cells. All apices of the 13000 r group showed this phenomenon and only one other shoot apex of 5000 r at 6 days appeared in this fashion. These histological observations are complemented by survival data (Table 3) and observation of field growth. Surviving plants which have received 4000 r and higher doses have six or seven mature leaves but since the shoot apex has been destroyed no new leaves are formed and the plant dies.

Fig. 15a is the shoot apex of a non-irradiated plant in leaf stage 6. Cell division has resumed after dormancy, as can be seen by the mitotic figure at the tip of the apex. However, there is no indication that a new leaf primordium is about to be initiated. In Fig. 15d, however, an advanced stage of development is shown. This is a shoot apex which received 2000 r. The shoot apex itself is larger and leaf 7 is being initiated, as indicated by the periclinal division in the tunica opposite and slightly above the attachment region of leaf 6. Based on the anatomical evidence (shoot apex size, cell number) and leaf number, it appears that plants which received 2000 r showed a "stimulatory" effect. If it is a real one then it is a transitory one, since the growth curves do not indicate such an effect. However, total number of leaves at maturity was not counted and it is conceivable that more leaves were produced by the shoot apex without this being reflected in the rate of extension of leaves. This is the only group at two days after irradiation in which this advance in development was found. Cytologically the nuclei and cytoplasm appeared similar to the controls. However, the plants which received 7000 r (Fig. 15c) and 13000 r (Fig. 15e) showed large numbers of micronuclei and vacuolation of the cytoplasm. In addition, their shoot apices often appeared elongated.

The prepared sections were also used to obtain a more quantitative estimate of the changes occurring in the shoot apex. Near median sections of each shoot apex were selected and their cell outlines copied from photographic enlargements. The median apical area was determined with a planimeter. The cells in this area were counted and average cell size was derived from these figures (Table 5). A detailed study of individual cell size was not undertaken but a survey of the histological preparations did not indicate an unusual variability in cell size. It should be pointed out that decisive quantitative evidence on cell size variability would require very large sample size because of the minute changes necessary to produce large differences. Also the stage of the shoot apex within a plastochron would have to be considered (Abbe et al. 1951).

From the same preparations which furnished the shoot apex data, cell size of the coleoptile could be determined. Cell length of this structure is shown in Table 6. It can be seen that at the lower doses cell elongation is inhibited but at the killing dose cell length is doubled. These observations in conjunction with the coleoptile curves of Fig. 6 indicate that at survival doses the inhibitory effect of irradiation is to a large extent on cell elongation. Only at the high doses, where cell division is stopped completely, does cell enlargement become a factor.

The histological picture then in general supports the seedling growth data. Under our experimental conditions growth of the apical meristem is inhibited progressively both with dose and time. At the highest dose very little cell division occurred after irradiation though there is considerable cell enlargement.

Between 3000 and 5000 r there is still some cell division and also some enlargement. The meristem, however, ceases to function around 6 days after treatment. The delay is apparently due to the fact that the cells haven't been sufficiently damaged and thus can persist through one or two cell divisions until enough genetic material has been lost by micronuclei so that further activity becomes

Table 5. *Histological analysis of median sections of shoot apices*

| Days | Control | Median shoot apex area in $\mu^2 \times 10^5$* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2000 r | 5000 r | 7000 r | 13000 r |
| 2 | 8.21 (3)** | 11.12 (2) | | 9.53 (2) | 10.52 (1) |
| 4 | | 10.35 (3) | 10.34 (2) | 10.48 (3) | 7.46 (1) |
| 6 | 8.79 (4) | 7.54 (2) | 10.47 (3) | 9.89 (6) | 8.11 (3) |

* The raw data indicate great individual variation. This probably is due to the stage of plastochron at which plants were sacrificed. — ** Number of individuals in sample.

| Days | Control | Average cell number per median section | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2000 r | 5000 r | 7000 r | 13000 r |
| 2 | 76.7 (3) | 113 (2) | | 88 (2) | 77 (1) |
| 4 | | 119 (3) | 80 (2) | 88 (3) | 60 (1) |
| 6 | 107 (4) | 105 (2) | 100.3 (3) | 85.8 (6) | 78 (3) |

| Days | Control | Average cell size in $\mu^2 \times 10^3$ per median section | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2000 r | 5000 r | 7000r | 13000 r |
| 2 | 10.87 (3) | 9.94 (2) | | 10.81 (2) | 13.63 (1) |
| 4 | | 8.69 (3) | 12.81 (2) | 11.97 (3) | 12.37 (1) |
| 6 | 8.12 (4) | 9.13 (2) | 10.33 (3) | 11.50 (6) | 10.31 (3) |

impossible. At these relatively moderate dosages adjacent cells probably can supply each other's metabolic deficiencies. On the basis of probability no two or three adjacent cells will have the same genetic regions affected. Once daughter cells are formed, larger areas should be involved, yet we did not see any evidence for this. All of the cells of the meristem appeared affected when death occurred; thus the all-or-none phenomenon which was also discussed in relation to seedling growth. It must be assumed that the histological aspects of radiation damage differ with species since Sagawa and Mehlquist (1957) found regeneration in the shoot apex of carnation, although Pratt (1959) did not observe regeneration in grapes.

## Summary

The purpose of this investigation was to find some relationship between growth, histogenesis, anatomy and genetic damage in irradiated seedlings of *Zea mays*.

It was hoped that these observations would furnish information on the mechanism of growth and survival of mutant cells.

1. Typical seedling growth curves were obtained when soaked corn embryos were irradiated and grown in Petri dishes for 6 days. A "stimulatory" effect at 500 r was found to be transient in both shoots and roots. The addition of indoleacetic acid did not alter the shapes of the curves materially nor did the auxin increase the number of survivors. It is suggested that a true assay of radiation effect can only be obtained when the ontogeny of the plant is examined at frequent intervals.

2. Embryos of $Yg_2\ yg_2$ constitution were irradiated and the number of yellow-green sectors per leaf was scored at maturity. The yellow-green phenotype results from the loss of one end of chromosome 9, and is a direct index for loss of genetic material in somatic cells. The analysis of sector frequency disclosed three categories of leaves, (a) those which were already present at time of irradiation of the embryo, (b) those which were present as part of the meristematic capital and (c) those which were formed by the few apical cells which constitute the apical initials. In the first group of leaves (3–6) a large number of short sectors can be found and frequency of mutant areas increases with dose. In the second group (7–9) fewer sectors are found and these sectors are continuous through the entire blade since each sector probably arose from a single mutant cell in the meristematic dome. The frequency of sectors in leaves 7, 8 and 9 also increases with dose. The final group of leaves (10 onward) shows a linear response to dose only up to a point and then the number of sectors reaches a plateau or a saturation level at approximately 0.9 sectors per leaf. The point of saturation is closely related to the $LD_{50}$ in the population examined. These responses do not seem to be altered by the water content or metabolic state of the embryos at time of irradiation.

3. The histology of the shoot apex strongly suggests an all-or-none phenomenon. At the critical dose the entire apex will begin to collapse about 6 days after irradiation. Dead or abnormal cells, suggesting cell selection within the apex, were not observed at sublethal doses. At lethal doses one or at best two cell divisions could occur before collapse of the meristem. Cell enlargement was observed at the high doses and occasionally one more leaf could be differentiated from the apex before death.

Table 6. *Average cell length in the coleoptile in micra*

| Control | 2000 r | 5000 r | 7000 r | 13000 r |
|---|---|---|---|---|
| 77.8 | 59.7 | 56.2 | 67.5 | 150.3 |

## Bibliography

Abbe, E. C., and B. O. Phinney: The growth of the shoot apex in maize: External features. Amer. J. Bot. **38**, 737—744 (1951). — Abbe, E. C., B. O. Phinney and D. F. Baer: The growth of the shoot apex in maize: Internal features. Amer. J. Bot. **38**, 744—751 (1951). — Abbe, E. C., L. F. Randolph and J. Einset: The developmental relationship between shoot apex and growth pattern of leaf blade in diploid maize. Amer. J. Bot. **28**, 778—784 (1941). — Anderson, E. G., A. E. Longley, C. H. Li and K. L. Retherford: Hereditary effects produced in maize by radiations from the Bikini atomic bomb. I. Studies

on seedlings and pollen of the exposed generation. Genetics **34**, 639—646 (1949). — Breslavets, L. P.: Plants and X-rays. Moscow: USSR Acad. Sci. Press 1946. — Caldecott, R. S.: Inverse relationship between the water content of seeds and their sensitivity to X-rays. Science **120**, 809—810 (1954). — Effects of hydration on X-ray sensitivity in *Hordeum*. Rad. Research **3**, 316—330 (1955). — Cuany, R. L., A. H. Sparrow and V. Pond: Genetic response of *Antirrhinum majus* to acute and chronic plant irradiation. Z. Vererb.-Lehre **89**, 7—13 (1958). — Ehrenberg, L.: Factors influencing radiation induced lethality, sterility and mutations in barley. Hereditas (Lund) **41**, 123—146 (1955). — Gaul, H.: Die verschiedenen Bezugssysteme der Mutationshäufigkeit bei Pflanzen angewendet auf Dosis-Effektkurven. Z. Pflanzenzüchtung **38**, 63—76 (1957). — Gordon, S. A.: Studies on the mechanism of phytohormone damage by ionizing radiation. Internat. Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy 1955. — Gray, L. H., and M. E. Scholes: The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Brit. J. Radiol. **24**, 82—348 (1951). — MacKey, J.: Neutron and X-ray experiments in barley. Hereditas (Lund) **37**, 421—464 (1951). — McClintock, B.: Maize genetics. Yearbook Carnegie Inst. **42**, 148—152 (1943). — The relations of homozygous deficiencies to mutations and allelic series in maize. Genetics **29**, 478—502 (1944). — Pratt, C.: Radiation damage in shoot apices of Concord grape. Amer. J. Bot. **46**, 103—109 (1959). — Quastler, H., A. M. Schertiger and W. N. Stewart: Inhibition of plant growth by irradiation. IV. Growth arrest vs. effects on mitotic activity. J. cell. comp. Physiol. **39**, 357—370 (1952). — Randolph, L. F.: Cytological and phenotypical effects induced in maize by x-rays and the Bikini Test Able atomic bomb. J. cell. comp. Physiol. **35**, 103—117 (Suppl. 1) (1950). — Rhoades, M. M.: The cytogenetics of maize. In: Corn and corn improvement. G. F. Sprague ed., pp. 123—219. New York: Academic Press 1955. — Sagawa, Y., and G. A. L. Mehlquist: The mechanism responsible for some X-ray induced changes in flower color of the carnation, *Dianthus caryophyllus*. Amer. J. Bot. **44**, 397—403 (1957). — Schwartz, D.: An interesting phenomenon associated with irradiation of dry maize seeds. Science **119**, 45—46 (1954). — Schwartz, D., and C. E. Bay: Further studies on the reversal in the seedling height dose curve at very high levels of ionizing radiations. Amer. Naturalist **90**, 323—327 (1956). — Sicard, M. A., and D. Schwartz: The effect of high doses of radiation on seedling growth. Rad. Research **10**, 1—5 (1959). — Skoog, F.: The effect of X-irradiation on auxin and plant growth. J. cell. comp. Physiol. **7**, 227—270 (1935). — Sparrow, A. H., J. P. Binnington and V. Pond: Bibliography on: Effects of ionizing radiations on plants 1896—1955. BNL 504 (L-103) (1958). — Stein, O. L., and D. Steffensen: Radiation-induced genetic markers in the study of leaf growth. Amer. J. Bot. **46**, 485—489 (1959).

Dr. Otto L. Stein, Assistant Professor, Department of Botany, Montana State University, Missoula, Montana, USA

Zeitschrift für Vererbungslehre 90, 503—506 (1959)

Kurze Mitteilung

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTWICKLUNG DER SUBMIKROSKOPISCHEN CHLOROPLASTENSTRUKTUR IN BLATTFARBMUTANTEN VON *ARABIDOPSIS THALIANA**

Von

GERHARD RÖBBELEN

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 23. Dezember 1959)*

Struktur und Funktion sind im Bereich des Lebendigen unlösbar miteinander verbunden. Ein vielversprechender Weg, diese Beziehungen im einzelnen zu klären, sind vergleichende Untersuchungen an Mutanten. In einer früheren Arbeit (RÖBBELEN 1957) wurden daher die Chloroplasten aus strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* im Lichtmikroskop morphologisch untersucht und ihre Pigmentausstattung und Funktionsfähigkeit mit diesen Befunden verglichen. In Fortsetzung dieser Versuche wurde begonnen, die Morphogenese der Chloroplasten aus denselben Mutanten auch elektronenmikroskopisch zu analysieren. Die Ergebnisse, über die die vorliegende Mitteilung eine kurze Übersicht geben soll, zeigen erneut, daß die Methode der „Mutantenanalyse" auch für zahlreiche Probleme der Entstehung und Funktion submikroskopischer Strukturen anwendbar und erfolgversprechend ist. Im einzelnen sollen unsere elektronenmikroskopischen Befunde an anderer Stelle an Hand der zugehörigen photographischen Belege beschrieben und ausführlich diskutiert werden.

In Abb. 1 stellt die Figur *G* einen schematischen Querschnitt durch einen typischen, normal grünen Chloroplasten dar, wie er bei *Arabidopsis* in der Ausgangsrasse (Normalform) in den Palisadenzellen der ausgewachsenen Kotyledonen zu finden ist.

Man erkennt dieselben Strukturen, die auch bei vielen anderen Objekten beobachtet wurden: eine doppelte Grenzmembran, das Stroma, dessen peripherer Anteil als lamellenfreies „Peristromium" ausgebildet ist und in das Stärkekörner eingelagert sind, zahlreiche Stromalamellen, die es in seiner ganzen Ausdehnung durchziehen, und Granadoppellamellen, die sich durch eine stärkere Osmiumeinlagerung und eine ausgeprägte Doppellamellierung als scharf begrenzte Bereiche von den Stromalamellen abheben.

Dieser komplexe Aufbau des funktionstüchtigen Chloroplasten entsteht während der Ontogenese der Pflanze durch eine Kette von einzelnen Entwicklungsschritten, die — soweit heute bekannt (vgl. MÜHLETHALER 1959) — in Abb. 1 durch die Stadien *A*—*F* schematisch gekennzeichnet sind.

* Die Untersuchungen konnten im Jahre 1957 durch das großzügige Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. S. STRUGGER und eine Spende des Universitätsbundes Göttingen e. V. im Botanischen Institut der Universität Münster i. Westf. begonnen werden. Herr Prof. Dr. E. S. PERNER führte mich in die elektronenmikroskopischen Präparationsmethoden ein; die ersten Aufnahmen machte Herr Priv.-Doz. Dr. L. REIMER. Die Arbeiten wurden im Zoologischen Institut der Universität Göttingen fortgesetzt. Allen Herren und Institutionen sei für ihre Unterstützung herzlich gedankt.

Bei den jüngsten, noch amöboiden Proplastiden (*A*) umschließt die äußere Doppelmembran eine gleichförmig dichte Grundsubstanz. Als erste Struktur entstehen in dieser durch Einfaltung der inneren Grenzmembran gleichzeitig an verschiedenen Stellen einzelne Cristae, an deren Ende Reihen von kleinen Bläschen abgeschnürt werden, die in das Stroma

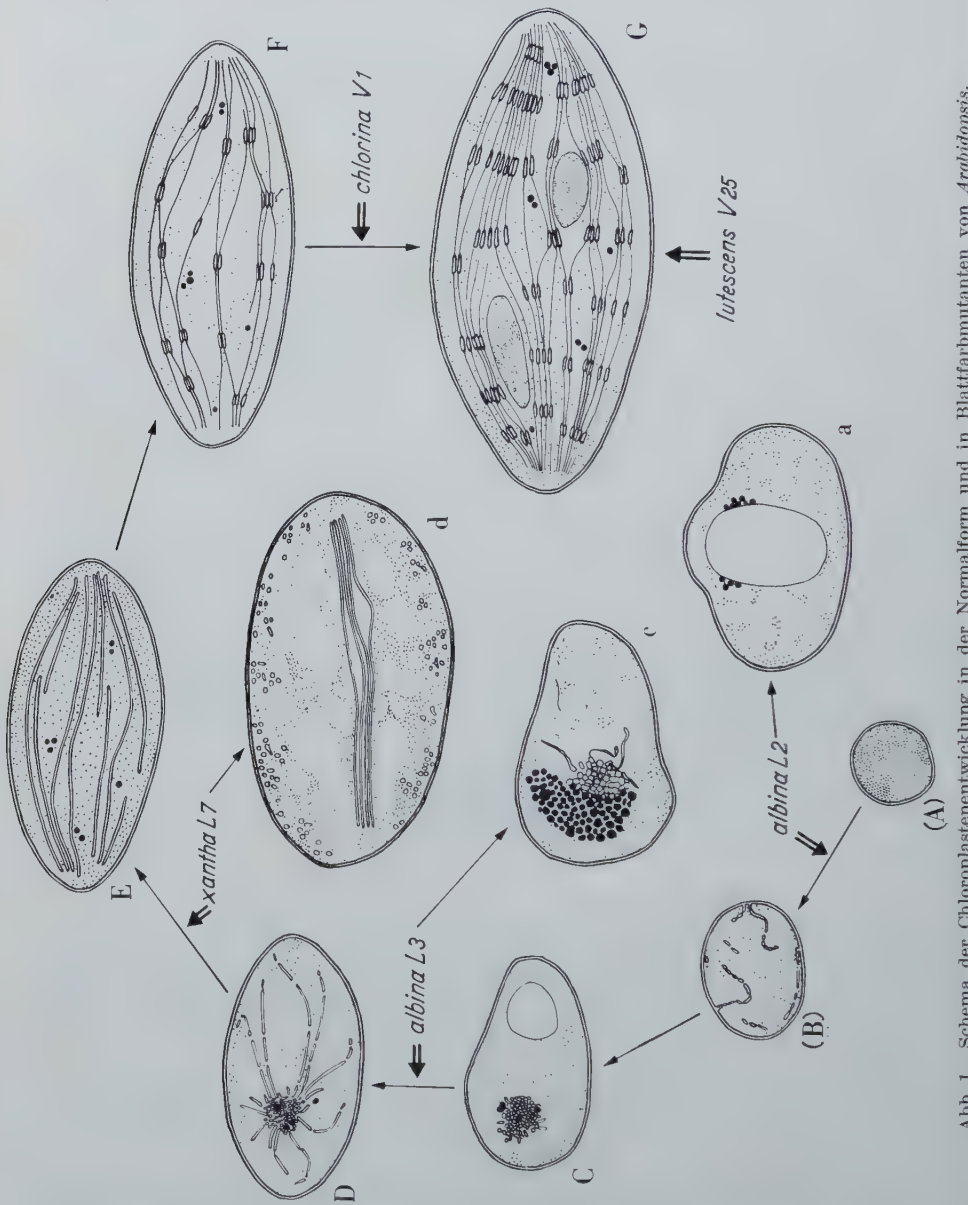



Abb. 1. Schema der Chloroplastenentwicklung in der Normalform und in Blattfarbmutanten von *Arabidopsis*. (Nähere Erläuterungen im Text)

„einwandern" (*B*). In den frühesten Entwicklungsstadien der Chloroplasten, die wir in den Palisadenzellen der gerade ergrünenden Kotyledonen von *Arabidopsis* nachweisen konnten, sind diese Bläschen schon in großer Anzahl vorhanden und liegen zu einem „Prolamellarkörper" geordnet dicht zusammen (*C*). Während die Kotyledonen weiter ergrünen, wachsen aus diesem Gebilde (durch Verschmelzen der Bläschen?) sternförmig erst einzelne, dann zahlreiche Lamellenzüge hervor (*D*), die schließlich die ganze Plastide erfüllen, während gleichzeitig der Prolamellarkörper immer mehr verschwindet (*E*). Zuletzt treten auch, offensicht-

lich regellos verstreut, die ersten distinkten Granadoppellamellen auf (*F*), deren Zahl rasch ansteigt, so daß der typische Zustand des erwachsenen Chloroplasten (*G*) bald erreicht ist.

Dieser normale Ablauf der Chloroplastendifferenzierung ist in den von uns elektronenmikroskopisch untersuchten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis* an verschiedenen Punkten unterbrochen.

Die Plastide, die in Abb. 1 als *a* schematisch wiedergegeben ist, stammt aus einem 10 Tage alten Keimblatt der *albina*-Mutante L 2 (vgl. Röbbelen 1957). Entsprechend den lichtmikroskopischen Bildern ließ sich auch im Elektronenmikroskop erkennen, daß die Plastiden dieser Mutante kurz nach der Entfaltung der Kotyledonen degenerieren, ohne daß in ihnen zuvor irgendwelche Bläschen oder Einfaltungen der inneren Grenzmembran festzustellen gewesen wären. In ihrem Stroma treten kurz vor Beginn der Degeneration lediglich einige dichte, stark osmiophile Tröpfchen (Globuli) auf. In den rein weißen Kotyledonen dieser Mutante ließen sich mit den von uns verwendeten Methoden keinerlei Chloroplastenpigmente nachweisen.

Eine zweite *albina*-Mutante, L 3, besitzt cremefarbene Kotyledonen und eine deutlich nachweisbare Menge von Carotinoiden. Die in Abb. 1 als *c* dargestellte Plastide aus dieser Form enthält eine erheblich größere Anzahl von Globuli, als wir sie je in den Chloroplasten der Mutante L 2 oder gar der Normalform fanden.

Dieselbe Erscheinung beschrieb v. Wettstein (1958) für die Plastiden einer *xantha*-Mutante der Gerste. Die Ähnlichkeit dieser Globuli mit den „dense spherical bodies", wie sie im Augenfleck mancher Algen oder in Chromoplasten vorkommen, läßt vermuten, daß auch sie carotinoidhaltige Chromolipoide darstellen, die sich infolge der genetischen Blockierung bestimmter Synthese- und Differenzierungsvorgänge in diesen Chloroplasten ungeordnet anhäufen.

In der Plastide *c* erkennt man weiterhin eine wabig vernetzte Struktur, die offensichtlich dem Prolamellarkörper normal sich entwickelnder Chloroplasten entspricht. Es kommt hier jedoch niemals zu einer „kristallgitterartigen" Anordnung der Bläschen, die später auch nur selten zu kurzen Lamellenstücken verschmelzen. Die Chloroplastenentwicklung wird in dieser *albina*-Mutante demnach zu einem Zeitpunkt unterbunden, zu dem in der Normalform die Stromalamellen sternförmig aus dem Prolamellarkörper auszuwachsen beginnen.

Erst in den Plastiden der *xantha*-Mutante L 7 (Abb. 1, *d*) kommt es zu einer wirklichen Lamellierung. Alle bisher von uns untersuchten Mutanten, die eine solche strukturelle Differenzierung erreichten, enthielten auch deutliche Mengen von Chlorophyll a und b. Eine Lamellenbildung in Abwesenheit von Chlorophyll, wie sie v. Wettstein (1958) in etiolierten Chloroplasten von Gerste beschreibt, fanden wir in Übereinstimmung mit den Befunden von Sager u. Palade (1954) und Hodge (1959) niemals. Es liegt daher nahe zu vermuten, daß diese Pigmente zur Stabilisierung der Lamellen notwendig sind. Einer solchen Vorstellung folgend, könnte man annehmen, daß die Farbstoffmenge in der dargestellten Plastide aus der *xantha*-Mutante L 7 nur für ein einziges Lamellenbündel ausreicht, das hier den ganzen Chloroplasten durchzieht. Eine Abgrenzung von distinkten Granen wird in diesen Lamellen noch nicht erreicht. Im peripheren Stroma erkennt man häufig zahlreiche Bläschen, die offensichtlich nicht mehr zur Lamellenbildung beitragen konnten. Die Chloroplastenentwicklung bleibt in dieser Mutante also noch einmal auf einer Zwischenstufe stehen, so daß auch diese Pflanzen schließlich letal (L) sind.

Erst die *Arabidopsis*-Mutanten, die eine bestimmte Mindestmenge von Chlorophyll synthetisieren können, bilden eine Chloroplastenstruktur aus, die jedenfalls in ihren letzten Entwicklungsstadien den Zustand eines funktionsfähigen, jungen Chloroplasten (*F*) erreicht. Alle solche Formen sind lebensfähig (V), sofern nicht andere Ursachen eine Letalität bedingen.

Die hier dargestellten Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in einer Tabelle zusammengefaßt. Sie sollen veranschaulichen, wie einzelne Mutationen in verschiedenen Entwicklungsstadien gleichzeitig die Ausbildung der submikroskopischen Struktur und die Farbstoffsynthese der Chloroplasten blockieren können. In der Reihe der in der Tabelle aufgeführten Mutanten entspricht einem höheren Pigmentgehalt eine immer weitergehende Differenzierung ihrer Chloroplastenstruktur.

Tabelle. *Farbstoffgehalt und Struktur der Chloroplasten in 10 Tage alten Kotyledonen normaler und mutierter Keimlinge von Arabidopsis thaliana*

| Mutante | Farbstoffgehalt in γ je g Frischgewicht | | | Submikroskopische Struktur |
|---|---|---|---|---|
| | Chlorophyll | | Carotinoide | |
| | a | b | | |
| *albina* L2—8/97 . . | 0 | 0 | 0 | Einzelne Globuli im Stroma (Abb. 1, *a*) |
| *albina* L3—8/74 . . | 0 | 0 | 44,4 | Zahlreiche Globuli, Prolamellarkörper (Abb. 1, *c*) |
| *xantha* L7—4/22 . . | 21,3 | 28,9 | 143 | Einzelne Lamellenbündel, Bläschen im lamellenfreien äußeren Stroma (Abb. 1, *d*) |
| *chlorina* V1—8/188 . | 284 | 93 | 373 | Noch relativ wenige Stromalamellen mit Granen (Abb. 1, *F*) |
| Normalform . . . . | 946 | 326 | 406 | Stromlamellen und Granenpakete (Abb. 1, *G*) |

Wie wir in neueren Untersuchungen an mehreren *lutescens*-Mutanten von *Arabidopsis* feststellten, kann diese schrittweise Veränderung in späteren Entwicklungsstadien auch in umgekehrter Richtung ablaufen. In diesen ebenfalls monohybrid spaltenden Mutanten geht mit dem Ausbleichen der voll entwickelten Chloroplasten von einem bestimmten Punkt ab ein irreversibler Zerfall des Lamellensystems einher. Stubbe u. v. Wettstein (1955) fanden bei *Oenothera* eine solche genetisch gesteuerte Degeneration der Chloroplastenstruktur nach Plastidommutationen; die Erscheinung ist jedoch nach den erwähnten Beobachtungen an *Arabidopsis* nicht, wie diese Autoren vermuteten, auf derartige Mutationen beschränkt.

## Literatur

Hodge, A. J.: Fine structure of lamellar systems as illustrated by chloroplasts. Rev. mod. Physics **31**, 311—341 (1959). — Mühlethaler, K.: Submikroskopische Morphologie. Chloroplasten. Fortschr. Bot. **21**, 52—54 (1959). — Röbbelen, G.: Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 189—252 (1957). — Sager, R., and G. E. Palade: Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas*. Exp. Cell Res. **7**, 584—588 (1954). — Stubbe, W., u. D. v. Wettstein: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera*. Protoplasma (Wien) **45**, 241—250 (1955). — Wettstein, D. v.: The formation of plastid structures. Brookhaven Symp. Biol. No 11, 1958, p. 138—159.

Dr. Gerhard Röbbelen, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen, Nikolausberger Weg 9

# Autorenverzeichnis des 90. Bandes


Anders, A., Genetische und histologische Untersuchungen über das Augenpigmentsystem von *Gammarus pulex* L. (*Crust. amph.*) S. 94

Auerbach, Ch., Spontaneous mutations in dry spores of *Neurospora crassa*. S. 335

Bauer, L., und M. Brosig, Zur Kenntnis reziproker Kreuzungen von *Funariaceen*. I. Die Bastarde *Funaria hygrometrica* × *Physcomitrium acuminatum* und reziprok. S. 400

Belitz, H. J., Chromosomenfragmente, minutes und sichtbare Mutationen bei *Drosophila* nach Behandlung mit Chinon I. S. 223

Bergfeld, R., Über das Verhalten zweier Zwergformmutanten von *Antirrhinum majus* L. bei Pfropfung und Behandlung mit Gibberellinsäure. S. 476

Brosig, M. s. Bauer, L. S. 400

Burla, H. s. Kälin, A. S. 83

Caspari, E., and F. J. Gottlieb, On a modifier of the gene *a* in *Ephestia kühniella*. S. 263

Cattanach, B. M., The sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of triethylenemelamine. S. 1

Ebersold, W. T., and R. P. Levine, A genetic analysis of linkage group I of *Chlamydomonas reinhardi*. S. 74

Egelhaaf, A. s. Kühn, A. S. 244

Esser, K., Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. II. Die Wirkungsweise der Semi-Incompatibilitäts-Gene. S. 29

— Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. III. Untersuchungen zur Genphysiologie der Barragebildung und Semi-Incompatibilität. S. 445

Faulhaber, I., Biochemische Untersuchungen zum Eiweiß-Stoffwechsel der Letalmutante *lethal giant larvae* (*lgl*) von *Drosophila melanogaster*. S. 299

Fiedler, H., und J. Schreiter, Das Pachytän-Genom von *Solanum vernei*. S. 62

Folsome, C. E. s. Levine, R. P. S. 215

Gottlieb, E. J. s. Caspari, E. S. 263

Gottschalk, W., Die Bildung von Keimzellen mit euploiden Chromosomenzahlen aus triploiden und aneuploiden Pollenmutterzellen abregulierender polyploider Pflanzen. S. 198

Green, M. M., Putative non-reciprocal crossing over in *Drosophila melanogaster*. S. 375

Harm, W., Untersuchungen zur Wirkungsweise eines die UV-Empfindlichkeit bestimmenden Gens der Bakteriophagen T 2 und T 4. S. 428

Hondelmann, W., Untersuchungen an einem mutablen Blütenfarbgen von *Callistephus chinensis* Nees. S. 159

Hunter, P. E., Selection of *Drosophila melanogaster* for length of larval period. S. 7

Ikeda, Y. s. Kiritani, K. S. 190

— s. Takahashi, T. S. 66

Jaenicke, L. s. Ziegler-Günder, I. S. 53

Kälin, A., und H. Burla, Biometrischer Vergleich zweier Populationen von *Drosophila obscura*. S. 83

Kiritani, K., Selection of fitter type nuclei in heterocaryons of *Aspergillus oryzae*. S. 182

— and Y. Ikeda, Heterosis observed in *Aspergillus oryzae* and its significance in Koji manufacture. S. 190

Kitani, Y. s. Ryan, F. J., R. Rudner and T. Nagata. S. 148

Kohiyama, M., Genetic interaction observed in *Bacillus subtilis*. S. 347

Kühn, A., und A. Egelhaaf, Über die Mutation *br (braunäugig)* bei *Ephestia kühniella*. S. 244

Levine, R. P., and C. E. Folsome, The nuclear cycle in *Chlamydomonas reinhardi*. S. 215

— s. Ebersold, W. T. S. 74

Löbbecke, E.-A., und I. Müller, Über die Auslösung von somatischen Mutationen bei *Ephestia kühniella* Z. durch weiche und mittelharte Röntgenstrahlen (10 bis 100 kV). S. 421

Mainx, F., Die Geschlechtsverhältnisse der Phoride *Megaselia scalaris* und das Problem einer alternativen Geschlechtsbestimmung. S. 251

Möller, E., Über Chromatideninterferenz. S. 409

Müller, I. s. Löbbecke, E.-A. S. 421

Murty, B. R. s. Swaminathan, M. S. S. 393

Nagata, T. s. Ryan, F. J., R. Rudner and Y. Kitani. S. 148

Renner, O., Paralipomena zur Genetik von *Oenothera*. S. 132

Röbbelen, G., Untersuchungen über die Entwicklung der submikroskopischen

Chloroplastenstruktur in Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana*. S. 503

Röhrborn, G., Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. S. 116

— Mutagenitätsuntersuchungen mit 1,4-Dimethylsulfonoxy-1,4-Dimethylbutan an *Drosophila melanogaster*. S. 457

Rohner, M. C., The influence of depression of respiratory metabolism by carbon monoxide on the pigment development in the insect eye. S. 257

Rudner, R. s. Ryan, F. J., T. Nagata and Y. Kitani. S. 148

Ryan, F. J., R. Rudner, T. Nagata and Y. Kitani, Bacterial mutation and the synthesis of macromolecules. S. 148

Schreiter, J. s. Fiedler, H. S. 62

Seyffert, W., Theoretische Untersuchungen über die Zusammensetzung tetrasomer Populationen. II. Selbstbefruchtung. S. 356

— Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen. II. „Superdominanz" bei *Silene armeria* L. S. 231

— Berichtigung zur Arbeit W. Seyffert, Untersuchungen über interallele Wechselwirkungen II, Z. Vererb.-Lehre, Bd. 90, 231—243 (1959). S. 374

Sperlich, D., Experimentelle Beiträge zum Problem des positiven Heterosiseffektes bei der strukturpolymorphen Art *Drosophila subobscura*. S. 273

Steffensen, D. M., s. Stein, O. L. S. 483

Stein, O. L., and D. M. Steffensen, The activity of X-rayed apical meristems: A genetic and morphogenetic analysis in *Zea mays*. S. 483

Stubbe, W., Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. S. 288

Sulbha, K. s. Swaminathan, M. S. S. 385

Swaminathan, M. S., and K. Sulbha, Multivalent frequency and seed fertility in raw and evolved tetraploids of *Brassica campestris* var. *toria*. S. 385

— and B. R. Murty, Effect of X-radiation on pollen tube growth and seed setting in crosses between *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*. S. 393

Takahashi, T., and Y. Ikeda, Genetic analysis of α-methyl-glucoside fermentation in *Saccharomyces*. S. 66

Wittmann, H. G., Vergleich der Proteine des Normalstamms und einer Nitritmutante des Tabakmosaikvirus. S. 463

Ziegler-Günder, I., und L. Jaenicke, Zur Wirkungsweise des *white*-Allels bei *Drosophila melanogaster*. S. 53